

M  
Tesis  
2493

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica

**EVOLUCIÓN GÉNICA DEL COMPLEJO  
TROPONINA EN INSECTOS**

TESIS DOCTORAL

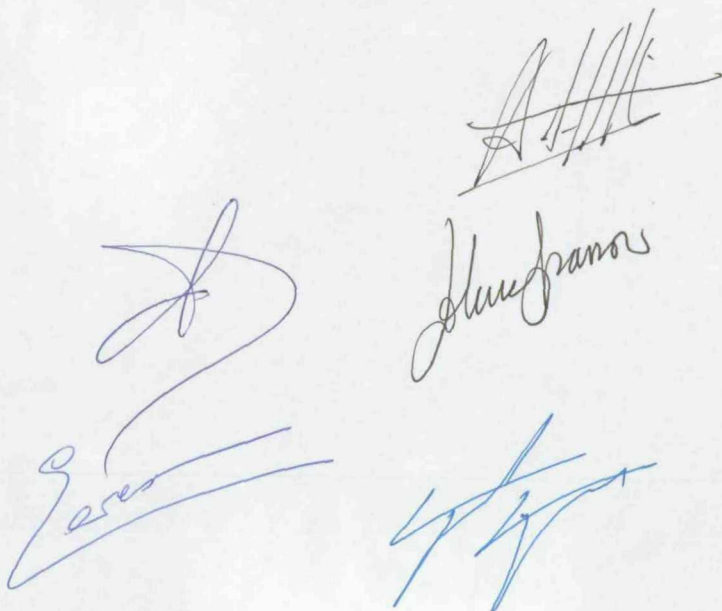
Reg. F.M. 23.697



**RAÚL HERRANZ BARRANCO**

Madrid, 2003

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la  
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral  
con la censura de SOBRESALIENTE "cum laude" POR UNANIMIDAD  
Madrid, 19, ENERO 2004



Four handwritten signatures in blue ink. The top right signature is the most stylized, with multiple vertical strokes. Below it is a signature that appears to read 'Juanfran'. To the left of these are two more signatures, one of which clearly shows the word 'Leres'.

UNIVERSIDAD AUTONOMA MADRID  
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 Nº. 200300017928  
24/11/03 10:20:15

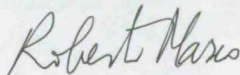
**Departamento de Bioquímica de la UAM**  
**Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid**  
**C/ Arzobispo Morcillo, 4**  
**Madrid 28029**  
**SPAIN**  
**Ph: 34-91-4975409 Fax: 34-91-5854401/34-91-4975353**

Roberto Marco Cuellar, con DNI 19359537T, Catedrático de Bioquímica, Biofísica y Biología Molecular, adscrito al Departamento de Bioquímica de la UAM

#### INFORMA

Que el Sr. Raul Herranz Barranco, Licenciado en Bioquímica por esta Universidad ha completado bajo mi dirección los requisitos para defender su Tesis Doctoral. La Memoria "*Evolución génica del Complejo Troponina en Insectos*" resume su excelente trabajo y muestra el grado de madurez alcanzado por el doctorando.

Madrid, a diecisiete de Noviembre del 2003



Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

## **EVOLUCIÓN GÉNICA DEL COMPLEJO TROPONINA EN INSECTOS**

Memoria que presenta para optar al grado de Doctor,  
el licenciado en Bioquímica,

**Raúl Herranz Barranco**

Director: Dr. **Roberto Marco Cuellar**

Catedrático en Bioquímica, Biofísica y Biología Molecular

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Madrid, Diciembre 2003



A mi familia

MARTE....E,

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría podido iniciarse sin el apoyo incondicional de mis padres y su continuo incentivo para “estudiar hasta el final”. Mi interés por la ciencia ha sido alimentado durante años por las numerosas y apasionantes conversaciones que mantuve con el mejor compañero de biblioteca que existe. Gracias Raúl G.

Debo dar las gracias a mi director de Tesis, el Dr. Roberto Marco, no sólo por haber conseguido financiarme durante estos años, sino por haber confiado en mi capacidad desde el primer momento, llegando incluso a hacerme responsable de todas las líneas de investigación del laboratorio B-20.

Durante la realización de los experimentos he necesitado la colaboración no sólo del laboratorio B-20, sino también de los laboratorios B-19 (Dr. Garesse) y B-18 (Dra. Cervera). El personal de estos laboratorios ha contribuido sin lugar a dudas a fortalecer mi carácter y a cerciorarme por un lado de lo importante que habría sido la colaboración con las personas más próximas y por otro de que se puede hacer cualquier cosa por uno mismo con un poco de paciencia. El servicio de secuenciación del IIB y el servicio de Informática de la Facultad (en la persona de Toño) y del IIB han sido fundamentales para la realización de este trabajo.

La calidad del trabajo que presento en esta memoria sería mucho menor sin la ayuda de varios investigadores que han colaborado con nosotros. Parte de los resultados que se presentan en esta memoria se han realizado en colaboración con el Dr. Cripps (University of New Mexico, Albuquerque (USA)), el Dr. Mas (B-18, Dpto. Bioquímica, UAM) y el Dr. Medina (Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC, Madrid)). En la elaboración de los manuscritos participaron activamente el Dr. Sparrow (University of York, York (UK)), la Dra. Cervera y el Dr. Manzanares (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIB-CSIC, Madrid)).

En mi propio laboratorio he recibido el apoyo diario del ahora Doctor Jesús Mateos Martín. Gracias por tu comprensión y por haberme tratado como un amigo a pesar de que no fui capaz de hacer lo mismo en tus peores momentos.

Pero si sólo pudiera agradecer esta tesis a una persona sería sin duda a Elena, que estuvo a mi lado apoyandome incondicionalmente, y que con su comprensión y colaboración, tanto a nivel técnico como teórico, ha evitado que desistiera en mi intención de finalizar mi carrera científica antes de haberla empezado. Gracias por cada día que estás a mi lado.

<b>ÍNDICE</b>	
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>6</b>
• Los insectos en el árbol de la vida.	6
• Ciclo vital y tipos musculares en los insectos.	11
• El sarcómero como unidad funcional de las fibras musculares.	15
• Componentes del complejo Troponina.	17
• Los genes del complejo Troponina en <i>Drosophila</i> .	20
• Patrón de expresión de los genes Troponina en <i>Drosophila</i> .	24
• Regulación de la expresión de los genes Troponina en <i>Drosophila</i> .	26
<b>OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
• Organismos utilizados.	29
• Disección de adultos y obtención de estadios del desarrollo.	29
• Extracción de ácidos nucleicos, retrotranscripción y PCR.	30
• Clonaje y secuenciación.	31
• Expresión por Northern Blot e Hibridación <i>in situ</i> .	32
• Herramientas bioinformáticas y números de acceso de secuencias.	32
• Árboles filogenéticos.	33
• Producción y testado de anticuerpos.	36
• Tinción inmunocitoquímica de embriones.	36
<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
• Localización de los genes TpnC en los genomas de insectos.	37
• Caracterización del nuevo gen TpnCII (DmTpnC25D) en <i>D. melanogaster</i> .	41
• Características de los genes TpnC. Comparaciones de secuencia.	43
• Patrón de expresión diferencial de los genes TpnC.	45

• Características de los genes TpnC. Las manos EF.	50
• Características de los genes TpnC. Orientación espacial de las manos EF.	53
• Características de los genes TpnC. Posición relativa de los intrones.	55
• Estructura de los genes TpnT y TpnI en insectos.	58
• Características de los genes TpnT y TpnI. Comparaciones de secuencia.	60
• Patrón de expresión diferencial de las isoformas de TpnT y TpnI.	62
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>67</b>
• Historia evolutiva de los genes Troponina C.	67
• Coevolución de los genes del complejo Troponina.	73
• Un modelo funcional integrador del repertorio de isoformas de los genes Troponina en los distintos tipos musculares de <i>Drosophila</i> .	76
• Perspectivas: Conservación de las regiones promotoras de la transcripción.	81
• Perspectivas: Análisis proteico del complejo Troponina.	83
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO. LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN “MICROGRAVEDAD” Y PUBLICACIONES.</b>	<b>87</b>
• Desarrollo de técnicas de fijación para la preservación de muestras en la ISS.	87
• Vuelo “TAXI” Misión Cervantes. Experimento AGE.	90
• Vuelo “TAXI” Misión Cervantes. Experimento GENE.	92
• Publicaciones Línea de Investigación “Troponinas”.	94
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>95</b>
<b>PUBLICACIONES ADJUNTAS</b>	
• Herranz, R., D. Husson, M. Pastor, J. M. Ruiz, C. Díaz, J. Mateos, A. Villa, F. J. Medina y R. Marco. 2002. <i>Towards the establishment of a permanent colony of Drosophila in the international space station: Hardware and adaptation of techniques</i> . J Gravit Physiol. 9 (1):357-58	
• Herranz, R., C. Díaz-Castillo, T. G. Nguyen, T. L. Lovato, R. M. Cripps y R. Marco. 2003. <i>Expression pattern characterization of the whole Troponin C gene repertoire during Drosophila development</i> . Mech Dev. (GEP letter). En prensa.	

## RESUMEN

Durante los últimos años la manera de hacer ciencia en biología molecular ha cambiado radicalmente. Hace diez años un doctorando podía dedicar el trabajo de su tesis a la secuenciación de un solo gen; ahora la secuenciación de genomas completos posibilita un nuevo tipo de trabajo experimental. En esta era genómica disponemos de una cantidad ingente de información y a pesar de las iniciativas de anotación automatizada, es necesaria la intervención directa de los bioquímicos para decidir cual es el verdadero contenido de los genomas.

En esta memoria presento el trabajo que he realizado en nuestro laboratorio con los genes del complejo Troponina en insectos. Hemos conseguido establecer definitivamente cuál es el número total de genes que codifican la Troponina C, y el de isoformas de procesamiento alternativo presentes en los genes de la Troponina T y la Troponina I. Se ha establecido el patrón de expresión de este repertorio de isoformas y su utilización diferencial en los diferentes tipos musculares de los insectos estudiados.

El análisis evolutivo que hemos realizado no sólo nos ha permitido localizar nuevos elementos de los genes ya descritos por comparación, sino que nos ha permitido reconstruir la historia evolutiva de estos genes y describir así una variedad de "soluciones evolutivas" muy diversas para cada tipo de gen y organismo. Merece interés el hecho de que aunque el camino evolutivo seguido por algunos genes en distintas especies ha sido diferente, el resultado final ha sido convergente, hasta el punto de que un repertorio similar de isoformas se puede encontrar en todos los insectos investigados.

Los músculos indirectos de vuelo han sido especialmente considerados dadas sus especiales características, su asincronía producida por el fenómeno de activación por estiramiento. Algunos de los nuevos genes e isoformas descritas podrían estar implicados en este mecanismo, que curiosamente ha evolucionado independientemente en distintos tipos de insectos. Combinando los dos tipos de abordaje utilizados, es decir, la coexpresión de isoformas en diferentes tejidos musculares de los insectos, y la coevolución de las secuencias implicadas en esas isoformas, hemos podido construir un modelo que explica el papel que puede tener toda la variabilidad genética descrita, en el contexto funcional de la regulación de la contracción muscular por el filamento fino en *Drosophila*.



## SUMMARY

During the last years, molecular biology research methods have changed remarkably. Ten years ago, a PhD student inverted several years of work for sequencing and characterizing a single gene. The amount of information that the genome projects provide, possible a new kind of research. In the current genomic era, annotation of the genomes although intended to be performed automatically, is still dependent on the direct analysis by field-experienced scientist for the deciphering of the genome information.

In this report I present the work performed during my PhD Thesis work on the Troponin Complex genes in insects. I have definitively established the number of genes that code for Troponin C, and how many alternative spliced isoforms are produced from Troponin T and Troponin I genes. Expression pattern of this isoform repertoire and their differential utilization in *Drosophila* muscle types has been established.

The evolutive analysis we have performed, not only has allowed us to identify new gene components initially omitted and revealed by sequences comparison among species, but also has encouraged us to rebuild the evolutive story of these genes in which each gene and organism has chosen a different evolutive solution to obtain their genetic variability. It is worth noticing that the different evolutive path has been followed by particular genes in different species, but the final result is a convergent series of genes, up to the point that similar repertoire of Troponin genes and isoforms has been found in all the insect species studied.

The indirect flight muscles have been specially considered for their particular properties such as their asynchronical contraction produced by the so-called stretch activation phenomenon. Some of the new genes and isoforms described in this report could be related to this phenomenon, that interestingly has evolved independently in different groups of insects. Putting together both approaches utilized, namely, the expression pattern of troponin isoforms in different muscle tissues in insects, and the coevolution of these isoforms sequences, we propose a model of the role that the described genetic variability can play in the functional context of the contraction regulation in thin filaments of *Drosophila* muscle.

## ABREVIATURAS

Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
Ds	<i>Drosophila subobscura</i>
Dp	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
Dv	<i>Drosophila virilis</i>
Dsil	<i>Drosophila silvestris</i>
Ag	<i>Anopheles gambiae</i>
Ad	<i>Anopheles dirus</i>
Aq	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>
Am	<i>Apis mellifera</i>
Ab	<i>Apidae</i> silvestre aislada en el campus de Medicina (UAM).
Li	<i>Lethocerus indicus</i>
TpnC	Troponina C (unión de Calcio)
TpnI	Troponina I (Inhibidora)
TpnT	Troponina T (Transductora o unión de Tm)
Tm	Tropomiosina
TmH (TpnH)	Tropomiosina H (o Troponina H, del inglés "Heavy")
Act	Actina
LMCA	Ancastro común de los metazoos (del inglés Late Metazoan Common Ancestor)
LACA	Ancastro común de los artrópodos
LICA	Ancastro común de los insectos
URE	del inglés Upstream Regulatory Element
IRE	del inglés Intron Regulatory Element
DNA	Ácido desoxirribonucleico (acrónimo del inglés)
RNA	Ácido ribonucleico (acrónimo del inglés)
ISS	Estación Espacial Internacional (del inglés International Space Station)
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa
Bp y KBp	Par de bases y mil pares de bases
Aa	Aminoácidos
KDa	Kilodalton
IFM	Músculos indirectos del vuelo (del inglés Indirect Flight muscles)
TDT	Músculo del salto (del inglés Tergal Depressor of the Trochanter)
AEDT	Ácido etilendiamintetracético

## INTRODUCCIÓN

### Los insectos en el árbol de la vida

Desde que Darwin estableciera definitivamente el papel de la evolución biológica en el origen de las especies (1859), hemos avanzado en la comprensión de los fenómenos que han generado la ingente cantidad de organismos que existen, y que han existido, en nuestro planeta. Aunque han pasado casi 150 años desde su trabajo, los mecanismos que controlan la especiación no se comprenden bien aún. No sólo se han encontrado ejemplos de evolución alopátrica (producida cuando una población queda aislada del resto de su especie y evoluciona independientemente) sino que aún hoy se publican ejemplos de evolución simpátrica espectaculares (Sorenson, Sefc y Payne, 2003).

Aunque hoy se tiende a olvidar, la clasificación de los organismos vivos *tampoco resulta trivial. La taxonomía y la filogenia de los organismos se aproxima bastante cuando estudiamos grupos relativamente próximos de organismos, incluso hasta el nivel de filo, por ejemplo los cordados. Sin embargo los orígenes y relaciones filogenéticas de los eucariotas primitivos son una incógnita (Baldauf, 2003a). Los principales grupos que nos van a interesar aparecen reflejados en la figura 1A. Dentro de los metazoos hay dos grandes grupos, los deuterostomos (que incluyen los precordados y los cordados), y los protostomos, que a su vez incluyen los grupos de lofotrochozoos (moluscos y anélidos entre otros) y ecdisozoos (artrópodos y nemátodos). Los grupos de artrópodos más diversificados son los crustáceos e insectos.*

La extraordinaria adaptabilidad de los insectos a múltiples nichos ecológicos les ha hecho prosperar durante más de 300 millones de años. Los insectos, el grupo de animales con mayor número de especies descritas, esta bien ubicado en el árbol de la vida (Varios autores, 2003). Las radiaciones evolutivas más importantes durante la evolución de los insectos aparecen reflejadas en la figura 1B. Algunos de los insectos más primitivos aún no podían plegar sus alas sobre el abdomen, como por ejemplo las libélulas (Odonata), pero la adaptación evolutiva que más nos va interesar en los insectos se refiere al sistema de contracción de los músculos de vuelo. En algunos órdenes superiores de insectos (subrayados en la figura 1B) los músculos del vuelo tienen un mecanismo de contracción asincrónico (mayor frecuencia de batido al número de estímulos nerviosos que recibe la fibra muscular), y se denominan músculos

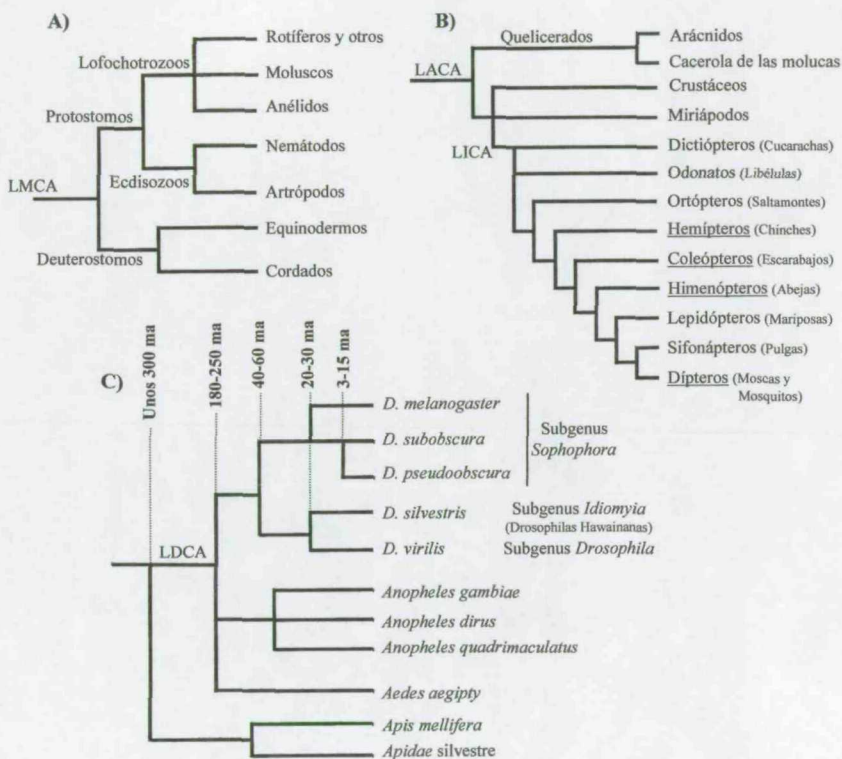


indirectos de vuelo (IFM) por estar anclados a la cutícula del tórax y no directamente a las alas. Las relaciones filogenéticas entre estos grupos implican que esta adaptación ha evolucionado independientemente en distintos tipos de insectos (Peckham y otros, 1992).

Hace ya un siglo que *Drosophila melanogaster* comenzó a utilizarse como sistema modelo. Muchos son los motivos que provocaron la introducción de este sistema en los laboratorios de genética de todo el mundo (ampliamente analizados en Kohler, (1994)). *Drosophila* es un organismo de pequeñas dimensiones y se alimenta de frutas fermentadas y levaduras, por lo que su mantenimiento no necesita mucho espacio y es barato. Tiene un tiempo de generación relativamente corto, su ciclo vital es de unos 11 días, por lo que se pueden realizar experimentos de selección (ver Anexo) y genética con relativa facilidad, especialmente desde que se desarrollaron las técnicas genéticas clásicas (mutantes, marcadores, balanceadores, etc...) por la escuela de Morgan. Además el descubrimiento de las técnicas de transformación mediadas por elementos P (Spradling y Rubin, 1982) han simplificado enormemente la generación de líneas transgénicas. El extensivo trabajo realizado con esta especie durante un siglo unido a la reciente secuenciación de su genoma (Adams y otros, 2000) hace de *Drosophila* uno de los organismos modelo mejor conocidos.

El éxito científico obtenido con *Drosophila melanogaster* a principios del siglo XX propició que algunos científicos extendieran su trabajo a otras especies de este género. Un papel relevante en ello tuvieron A. Sturtevant, discípulo de Morgan, y T. Dobzhansky. En términos evolutivos *Drosophila* ha resultado ser tan productiva como en los clásicos campos del desarrollo y la genética (Powell, 1997). Se han descrito más de 2000 especies dentro de este género, y más de 800 son endémicas del archipiélago de Hawai. En la figura 1C podemos observar las relaciones filogenéticas que vinculan las especies de insectos que hemos utilizado en esta memoria. El género Drosophilidae se divide básicamente en dos subgéneros producidos por dos intensas diversificaciones de las especies, el subgénero *Drosophila* (representado por *D. virilis* en nuestro estudio) que también engloba las *Drosophilas* hawaianas (clasificadas en el subgénero alternativo *Idiomyia* por algunos autores (Powell, 1997)) y el subgénero *Sophophora*. En este último grupo encontramos la especie *D. melanogaster*, cuyo origen biogeográfico se encuentra en el África subsahariana, pero que actualmente se encuentra extendida por todo el mundo, y las especies de climas templados *D. pseudoobscura* (variedad norteamericana, cuyo genoma está prácticamente secuenciado) y *D.*

*subobscura* (variedad europea, aunque una pequeña invasión llegó a Sudamérica unos años atrás provocando un experimento evolutivo que pudo ser seguido en directo (Powell, 1997)).

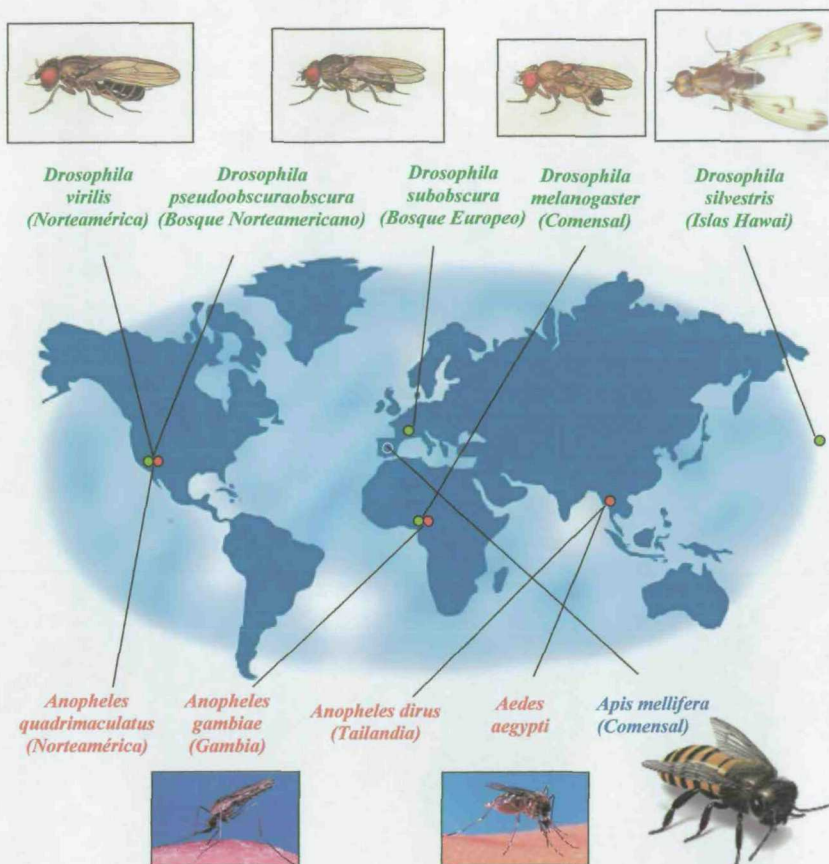


**FIGURA 1.** Los insectos en el árbol de la vida. En esta figura se muestran las relaciones evolutivas entre distintos tipos de organismos. **A)** Principales divisiones de los metazoos. **B)** Relaciones filogenéticas en los artrópodos, y especialmente entre las familias más diversificadas de insectos. Los grupos de insectos en los que se ha localizado el mecanismo asincrónico de los IFMs aparecen subrayados (Peckham y otros, 1992), implicando que este mecanismo se ha producido varias veces durante la evolución de los insectos. **C)** Representación de la distancia evolutiva (en millones de años) y relaciones filogenéticas entre los insectos utilizados en este trabajo.

Estas especies de *Drosophila* nos van a permitir estudiar cómo han evolucionado los genes del complejo Troponina durante los últimos 60 millones de años aproximadamente. Este tiempo es suficiente para encontrar altas variaciones de secuencia en regiones no traducidas que pueden ser utilizadas para estudios de regulación de la expresión génica (Benoist y otros, 1998, Mas, García-Zaragoza y Cervera, En prensa). En nuestro caso vamos a estudiar las secuencias codificantes de los genes y algunos eventos “raros” en la evolución molecular, como son las inserciones y delecciones de intrones. Para ello hemos extendido nuestro análisis a dos grupos más de insectos (Figura 2). Por un lado otro género de dípteros, *Culicidae*, cuyo representante más conocido es *Anopheles gambiae* (disponemos en el laboratorio de muestras de dos especies más de este género, *Anopheles dirus* y *Anopheles quadrimaculatus*, pero a pesar del interés comparativo que tendrían estos datos, por problemas técnicos, no se presentará ningún resultado con estas especies). Dado que este mosquito transmite la malaria su importancia biomédica ha promovido la secuenciación de su genoma en tan sólo un año y medio (Holt y otros, 2002). Esto ha motivando la aparición de nuevos trabajos de comparación de su genoma con el de *Drosophila* (Zdobnov y otros, 2002). Algunos datos de este trabajo están reflejados en la Tabla 1. Es relevante señalar que aunque ambos organismos disponen de cuatro cromosomas, la macro y microsentenia (ordenamiento relativo de los genes en los cromosomas) no se han conservado, como comprobaremos más adelante en el caso de los genes Troponina. De hecho ni siquiera están conservadas dentro del género *Anopheles* (Sharakhov y otros, 2002).

	<i>Anopheles</i>	<i>Drosophila</i>
Tamaño del genoma (bp)	278.244.063	122.653.977
Longitud media de las proteínas (aa)	548	649
Longitud media de los intrones (bp)	1061	628
Longitud media de los exones (bp)	366	443
Número total de exones	27.380	30.762
Número total de intrones	21.279	24605
Longitud total codificante (bp)	10.009.635	13.635.856
Longitud total de los intrones (bp)	22.572.174	12.861.230
Número medio de intrones por gen	3,47	4,67

**TABLA 1.** Comparación de los genomas de *Drosophila melanogaster* y *Anopheles gambiae*. El dato más relevante es el aumento en la longitud de los intrones del mosquito, de un modo paralelo al aumento en el tamaño de su genoma. Datos extraídos de (Zdobnov y otros, 2002).



**FIGURA 2.** Imágenes y localización geográfica de las especies utilizadas. En verde (línea superior) se muestran las especies de *Drosophila* utilizadas. En la línea inferior se muestran otros insectos utilizados, en rojo los mosquitos (la secuenciación de *Aedes aegypti* aún no ha avanzado lo suficiente para obtener sus genes Troponina) y en azul la abeja común utilizada en apicultura (hemos utilizado también una especie silvestre del género *Apis*).

El tercer grupo de insectos que hemos incluido en nuestro estudio son las abejas (himenópteros). Al estar más alejados evolutivamente de *Drosophila* nos han permitido definir mejor el origen de la variabilidad genética de los genes Troponina en los insectos. Al igual que ocurre con *D. pseudoobscura* la secuenciación del genoma de la

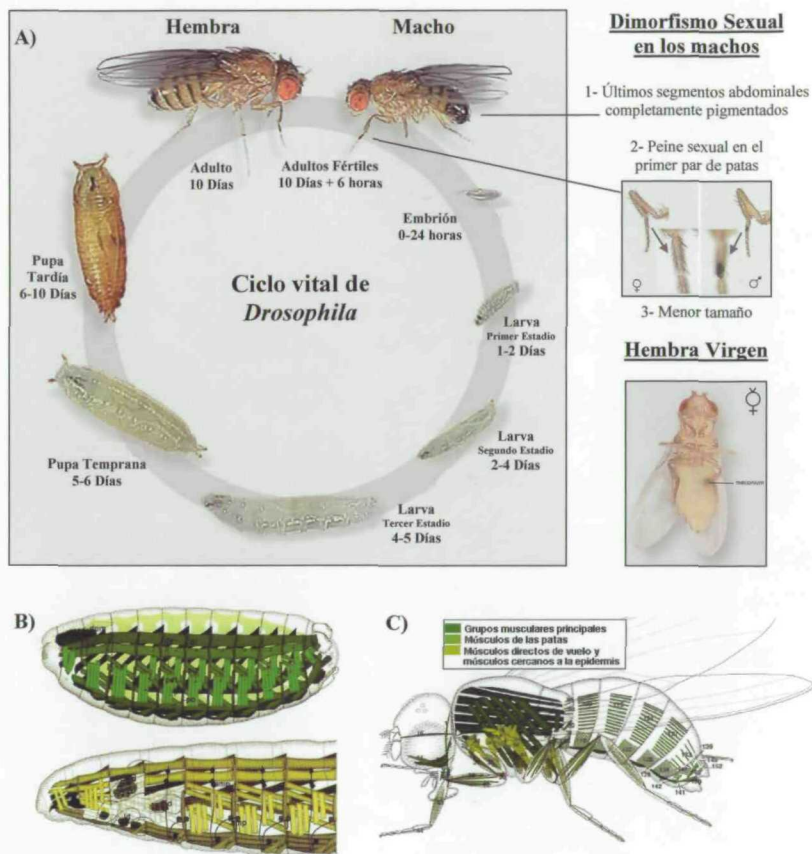


abeja está casi completada (en este caso por ser *Apis mellifera* el insecto más interesante para la economía humana). El tamaño de este insecto, mucho mayor que el de *Drosophila*, ha permitido realizar disecciones mucho más exactas de distintos grupos de músculos para estudiar en ellos la expresión de los genes Troponina. Además de disponer de la especie *Apis mellifera* (Am) hemos obtenido una población silvestre del género *Apidae* (Ab) del propio campus de Medicina de la UAM.

### Ciclo vital y tipos musculares en los insectos

Los insectos holometábolos como *Drosophila*, *Anopheles* y *Apis* poseen un ciclo vital dividido en dos fases, separadas por la metamorfosis (Figura 3A). En el caso de *Drosophila* el desarrollo embrionario a 25°C (Bate y Martínez-Arias, 1993, Powell, 1997) dura unas 24 horas, momento en el cual emerge la larva que pasará por tres estadios larvarios mudando dos veces la cutícula. A los 5 días de desarrollo comienza la pupación de la larva. En este momento la mayoría de los tejidos larvarios serán histolizados y la morfología del adulto se generará a partir de los discos imaginales. El adulto emerge del pupario aproximadamente el décimo día del desarrollo. La reproducción será posible de 6 a 8 horas tras la emergencia y la vida media de *Drosophila* en condiciones óptimas se sitúa en unas ocho semanas. Los individuos pueden ser sexados en base a varios criterios; el tamaño, mayor en las hembras, la pigmentación y forma del abdomen (ver figura 3A) y el “sex comb” o peine sexual del primer par de patas, ausente en las hembras (Demerec, 1950).

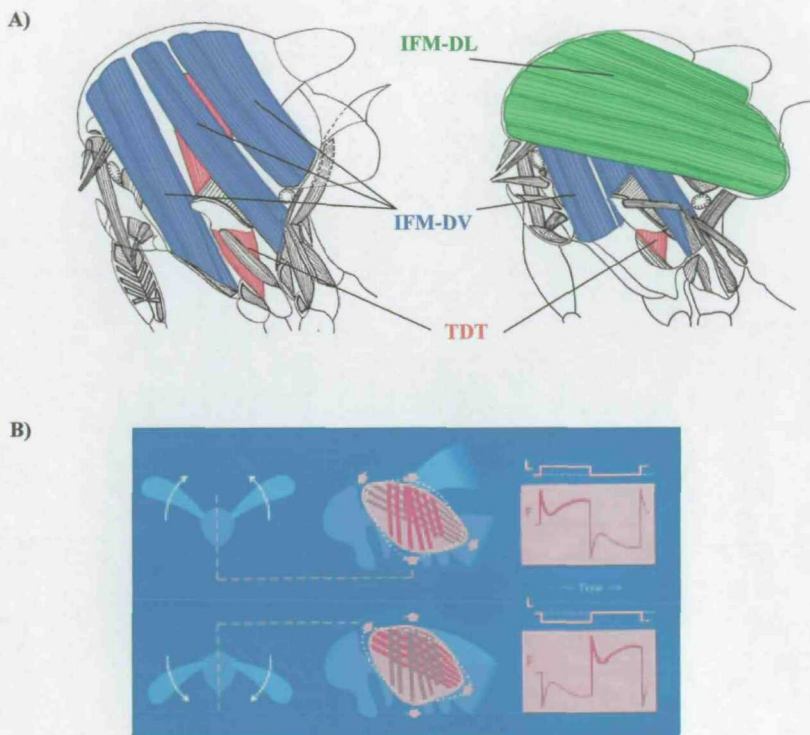
*Drosophila* va a disponer por tanto de dos sistemas musculares distintos, el embrionario-larvario y el de adulto (Bate y Martínez-Arias, 1993). Durante la embriogénesis se genera la musculatura embrionaria, compuesta por los músculos hipodérmicos (mantienen la integridad de la larva y permiten su locomoción), los músculos viscerales longitudinales y transversales (responsables de los movimientos peristálticos del sistema digestivo) y el conducto dorsal que combina las funciones del corazón y la aorta de los vertebrados (figura 3B). El sistema muscular del adulto (figura 3C) no se genera por completo a partir de los discos imaginales. Los músculos hipodérmicos y los IFM dorso-ventrales se generan a partir de esbozos de los músculos larvarios que no se histolizaron completamente (Ruiz Gomez y Bate, 1997). Los músculos cefálicos, los músculos del salto (TDT) y los IFM dorso-longitudinales se generan a partir de precursores localizados en los discos imaginales (Fernandes, Bate y Vijayraghavan, 1991).



**FIGURA 3. Ciclo vital y sistemas musculares de *Drosophila*.** A) Como se describe en el texto, el desarrollo de *Drosophila* comprende una fase larvaria y una fase de pupación que culmina con la eclosión a los 10 días. Las principales diferencias morfológicas entre hembras y machos son expuestas, así como el aspecto de una hembra virgen recién emergida. B) Musculatura embrionario-larvaria. C) Musculatura del adulto. Mientras que los músculos abdominales y larvarios mantienen su identidad segmental, los IFMs del adulto se extienden a lo largo de los tres segmentos torácicos y se han generado, en parte, “de novo”. Imágenes modificadas a partir de las obtenidas en la página web Flymove, en Bate y Martínez-Arias (1993) y en Demerec (1950).

Los músculos más interesantes para la mayoría de los investigadores interesados en la contracción muscular en *Drosophila* son aquellos relacionados con el vuelo. En condiciones de laboratorio la capacidad de volar es prescindible para estos insectos por lo que se pueden localizar mutantes de genes musculares implicados en el vuelo sin afectar a la viabilidad del organismo. Los músculos del salto (TDT) son necesarios para el despegue de las moscas y los músculos directos de vuelo (DFM) están implicados en el control de la posición de las alas, siendo los músculos indirectos de vuelo (IFM) los que proporcionan la propulsión necesaria para el batido de las mismas. Los músculos indirectos de vuelo reciben su nombre por su mecanismo de acción, ya que no mueven directamente las alas, sino que por su distribución y anclajes en el tórax provocan un movimiento oscilatorio en la cutícula del insecto que se transmite así a las alas. En primer lugar las fibras dorsoventrales (Figura 4A en azul) provocan la elevación de las alas y la posterior contracción de las fibras dorsolongitudinales (Figura 4B en verde) provoca el batido (Vigoreaux, 2001).

Los IFM tienen además la propiedad de ser asincrónicos. El resto de músculos de *Drosophila* y los músculos esqueléticos de los vertebrados tienen una frecuencia de contracción no superior a 50 Hz. Los IFM de *Drosophila* alcanzan frecuencias de 200 Hz y en algunos mosquitos pueden incluso superar esos valores. Si los IFM respondieran de forma sincrónica a los impulsos nerviosos que promueven su contracción, el alto número de impulsos nerviosos provocaría una contracción tetánica incontrolable. Los IFMs en algunos insectos y el músculo cardíaco de los vertebrados son asincrónicos, se activan con una frecuencia mayor al número de estímulos nerviosos que reciben, consecuencia del fenómeno denominado activación por estiramiento (stretch-activation). Este fenómeno implica la existencia de isoformas específicas de IFM. El impulso nervioso es necesario para iniciar y regular la intensidad de la contracción por los niveles de calcio intracelular. Este mecanismo pudo haber surgido para minimizar la energía necesaria durante la contracción por efecto de la propia elasticidad torácica (Sparrow, 1995), y precisamente este ahorro energético ha provocado la mejor adaptabilidad evolutiva de los insectos con IFM y su amplia distribución geográfica. Ya se ha comentado que este mecanismo ha surgido y ha sido seleccionado independientemente en diferentes tipos de insectos.



**FIGURA 4. Distribución y funcionamiento de los músculos del vuelo en *Drosophila*.** A) Localización de los paquetes musculares torácicos mayoritarios. IFM-DL (verde) , IFM-DV (azul) y TDTs (rojo). También se muestran otros pequeños músculos. B) Mecanismo oscilatorio propuesto para la contracción asincrónica de los IFMs y su repercusión en la alta frecuencia del batido de las alas. La contracción de las fibras IFM-Dorsoventrales provoca la elevación de las alas y la posterior contracción de las fibras IFM-Dorsolongitudinales provoca el batido. Al ser fibras antagonistas, la contracción de unas provoca la relajación de las otras permitiendo que, por la propia elasticidad del tórax, el sistema entre en oscilación provocando un alto número de batidos por segundo con un consumo energético mínimo. Figura tomada de Vigoreaux (2001).

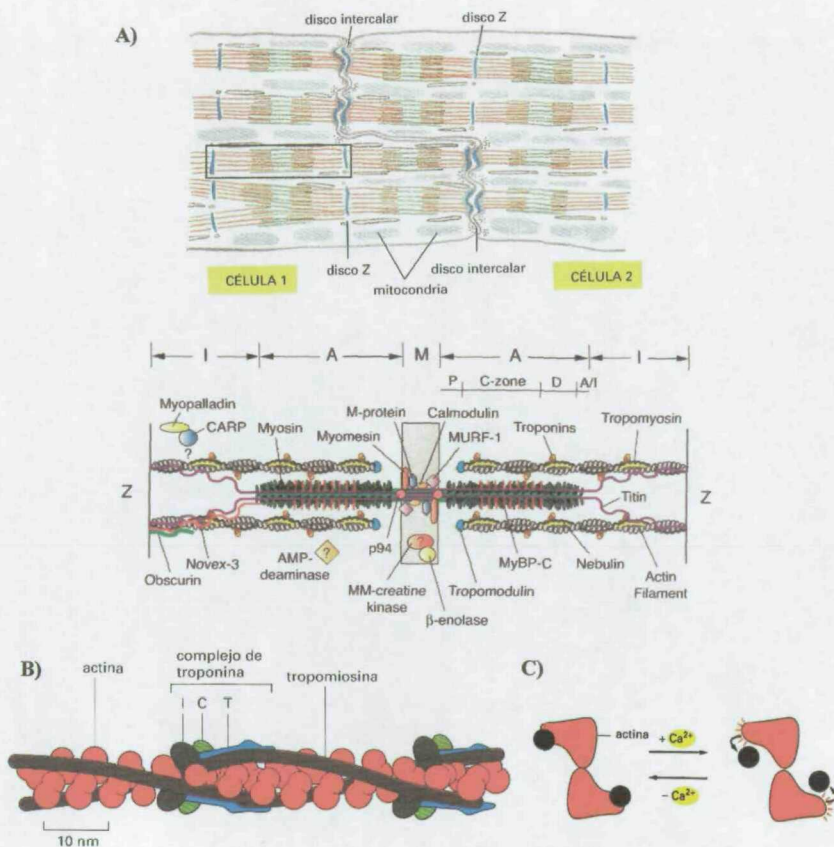


### **El sarcómero como unidad funcional de las fibras musculares**

La composición molecular de las fibras musculares, especialmente en el caso del músculo estriado de vertebrados, está siendo estudiada extensivamente identificándose nuevos miembros de la intrincada red de macromoléculas que lo forman, como puede verse en las revisiones más recientes (Clark y otros, 2002). La apariencia de las miofibrillas al microscopio óptico se puede observar en la figura 5A. La unidad contráctil básica del músculo es el sarcómero, delimitado por los discos Z donde se anclan los sistemas tubulares del mismo. La banda I (Isotrópica al microscopio óptico) está compuesta básicamente de filamentos de actina (filamentos finos). La banda A (Anisotrópica al microscopio óptico) contiene además los filamentos de miosina (filamentos gruesos). Dos filamentos compuestos por proteínas gigantes (nebulina y titina) completan la arquitectura básica del sarcómero y conectan las redes de filamentos con los discos Z y la zona central del sarcómero (disco M).

Los filamentos gruesos están compuestos principalmente por hexámeros de miosina (dos cadenas pesadas -180kDa-, dos ligeras reguladoras y dos ligeras esenciales -20KDa-). Las cadenas pesadas aparecen enrolladas formando una estructura “coiled-coil” (Cohen y Holmes, 1963) con sus dominios de hélice alfa, mientras que utilizan dos regiones globulares para interaccionar con las cuatro cadenas ligeras. En las regiones globulares aparecen los sitios de unión de ATP y la zona de interacción con el filamento fino. En el filamento grueso de invertebrados se han localizado proteínas adicionales, como la paramiosina y la miniparamiosina (Epstein y otros, 1985, Vinos y otros, 1991, Maroto y otros, 1995) cuyas proporciones relativas varían en distintos tipos musculares. Estas isoformas exclusivas de invertebrados pueden estar implicadas en el hecho de que en estos organismos los filamentos de actina y los de miosina regulan simultáneamente la contracción muscular (Lehman y Szent-Gyorgyi, 1975).

Los filamentos finos (Figura 5B) están compuestos por la asociación de monómeros de actina G (42 KDa) capaces de unir ATP, que se asocian desde la banda A hasta el disco Z. El resultado es una doble hélice dextrógira (actina F) de 14 monómeros por vuelta, sobre cuyos surcos se disponen dos monómeros de Tropomiosina (Tm, 45 KDa cada uno), parcialmente arrollados que interaccionan entre sí cabeza-cola. Un complejo Troponina, principal regulador de la contracción muscular en vertebrados (Filatov y otros, 1999, Gordon, Homsher y Regnier, 2000), se sitúa sobre cada molécula de Tropomiosina.



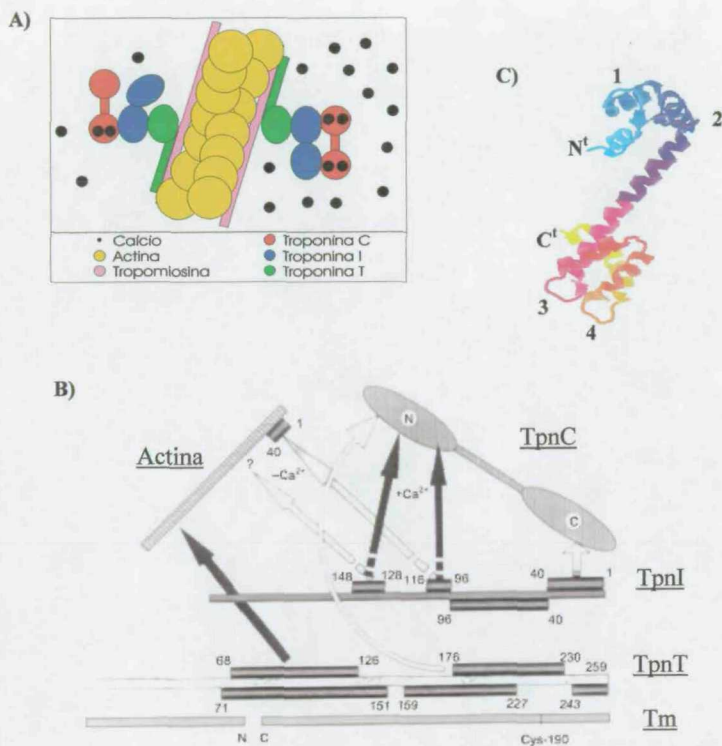
**FIGURA 5. El sarcómero como unidad funcional del músculo.** A) Representación esquemática de la apariencia de las fibras musculares al microscopio óptico, resaltando los filamentos finos de actina (rojo) en la banda I, los filamentos de miosina (verde) en la línea M y ambos filamentos en la banda A (anisotrópica al microscopio óptico). Aparece recuadrado un sarcómero, cuya composición y organización molecular en vertebrados esta representada en el esquema inferior (Clark y otros, 2002). B) Distribución de los componentes del filamento fino en vertebrados. C) Desplazamiento de la tropomiosina con respecto a la actina en presencia de calcio. Figuras tomadas de Alberts y otros (1996).

Cuando el estímulo nervioso que promueve la contracción alcanza la fibra muscular se provoca un aumento en la concentración intracelular de calcio. El complejo Troponina es capaz de detectarlo, promoviendo una cascada de cambios conformacionales que desemboca en un desplazamiento de la tropomiosina sobre el filamento de actina (Figura 5C). De este modo queda expuesto el dominio de interacción con la miosina y el entrecruzamiento entre el filamento fino y el grueso provoca la contracción muscular (Craig y Lehman, 2001).

### Componentes del complejo Troponina

El complejo Troponina está formado por tres proteínas. La Troponina C (TpnC) es la encargada de detectar el aumento intracelular de calcio. La Troponina I (TpnI) tiene un papel inhibitor, encargada en condiciones basales de calcio de bloquear la acción de la Troponina T (TpnT), cuyo papel es transmitir a la Tropomiosina el cambio conformacional necesario para que se produzca la contracción (Figura 6A). Las secuencias específicas que intervienen en las distintas interacciones en el complejo Troponina de vertebrados (Figura 6C) se han localizado utilizando construcciones con distintos dominios mutados (Reinach y otros, 1997, Filatov y otros, 1999).

La TpnC tiene una estructura que recuerda a una mancuerna (Figura 6B). Está constituida por dos dominios globulares separados por dos hélices  $\alpha$  unidas por una glicina (Grabarek, Tao y Gergely, 1992), a la cual se atribuye la movilidad necesaria que permite el plegamiento de la proteína para adquirir una disposición más compacta en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cada dominio globular posee dos manos EF encargadas de ligar cationes. Las afinidades de cada mano EF han sido estudiadas en mamíferos. En el dominio carboxilo terminal se localizan la tercera y cuarta manos EF, ambas con alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ . Dado que este dominio se considera estructural por estar siempre ocupado por cationes, su secuencia debería estar mejor conservada que la del dominio amino terminal, dominio regulador, que posee la primera y segunda manos EF, ambas con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  y libres en condiciones basales. Estas estructuras y afinidades se han caracterizado en otras proteínas, como la proteína reguladora de la cadena ligera de la miosina (da Silva, Kendrick-Jones y Reinach, 1995), demostrando que la especificidad y afinidad por iones  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  se conserva en distintas proteínas.



**FIGURA 6. Estructura del complejo Troponina en vertebrados.** A) Representación de la estructura del complejo Tpn en condiciones basales de calcio (izquierda, la TpnC solo tiene ocupadas las dos manos EF con alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ ) y en alta concentración de calcio (derecha, la TpnC tiene ocupados los cuatro sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y se une a la TpnI con ambos dominios de modo antiparalelo ( $\text{C}^t$  con  $\text{N}^t$  y  $\text{N}^t$  con  $\text{C}^t$ ) iniciando los cambios estructurales en el complejo, y en la Tropomiosina, que acaban liberando el sitio de unión de la ATPasa en los monómeros de actina para provocar la contracción muscular). B) Representación de los dominios de interacción en condiciones basales de calcio (flechas blancas) o en alta concentración de calcio (flechas negras) en mamíferos (Filatov y otros, 1999). C) Estructura tridimensional obtenida por cristalización de una TpnC de vertebrados (*Oryctolagus cuniculus*). Las manos EF 3 y 4 en el dominio  $\text{C}^t$  siempre están ocupadas por cationes calcio o magnesio.



Sin embargo las Troponinas C de vertebrados e invertebrados son bastante diferentes. De hecho, aparecen en grupos distintos de la clasificación de proteínas con manos EF de Kretsinger (Nakayama, Moncrief y Kretsinger, 1992, Nakayama y Kretsinger, 1993, 1994, Kawasaki, Nakayama y Kretsinger, 1998), e incluso algunas manos EF han perdido su funcionalidad en las Troponinas C de invertebrados. Se han publicado trabajos sobre las TpnCs en algunos invertebrados como *C.elegans*, así como en *Balanus nubilus* (un tipo de percebe, un crustáceo), *Chlamys nipponensis akazara* (un molusco) y el hemíptero *Lethocerus indicus* (Allhouse y otros, 1999, Ojima y otros, 2000, Ueda y otros, 2001, Qiu y otros, 2003), estableciéndose la inequívoca funcionalidad de la cuarta mano EF. En todos los casos tiene un papel regulador (baja afinidad por calcio), no como en mamíferos, en los cuales esta mano EF tiene alta afinidad por calcio/magnesio. También se ha observado que una región diferente de la cuarta mano EF en la mitad carboxilo terminal de la TpnC de percebe une magnesio, estabilizando la interacción TpnC-TpnI. En los mismos trabajos se describe que cuando aparecen dos isoformas diferentes de TpnC en un mismo tejido, normalmente una de ellas sólo tiene funcional la cuarta mano EF mientras que la otra también mantiene la funcionalidad de la segunda mano EF.

La Troponina I y la Troponina T tienen un papel básicamente estructural dentro del complejo Troponina, no obstante la Troponina I es capaz de inhibir la actividad ATPasa de la actomiosina independientemente (Leavis y Gergely, 1984). Su tamaño molecular es muy variable dado que existen diferentes isoformas obtenidas por procesamiento alternativo de exones. La isoforma más abundante de Troponina I en vertebrados tiene un peso molecular de 21 KDa, mientras que sus homólogos en *Drosophila* tienen pesos moleculares teóricos de 25, 30 y 35 KDa dependiendo de los exones alternativos utilizados (Barbas y otros, 1991, Barbas y otros, 1993). Desde el punto de vista estructural es capaz de interaccionar con la TpnC, la TpnT y la actina de una manera calcio-dependiente, utilizando para ello la mayor parte de su extensión (Figura 6B).

La Troponina T también tiene un tamaño menor en vertebrados (36-39 KDa, (Schiaffino y Reggiani, 1996)) frente a *D. melanogaster* (47-53 KDa, (Bullard y otros, 1988)). En este caso, el aumento de tamaño se debe en gran parte a una cola de poliglutámicos en la región carboxilo terminal de la TpnT de invertebrados, cuyo tamaño es variable en los diferentes grupos filogenéticos (Benoist y otros, 1998). Aunque prácticamente la totalidad de la proteína participa en la interacción con la TpnI

y la Tm para mantener la integridad del complejo Troponina (Filatov y otros, 1999, Gordon, Regnier y Homsher, 2001), se ha descrito que puede tener un papel directo en la unión de cationes calcio, tanto en vertebrados (Potter y otros, 1995, Schaertl, Lehrer y Geeves, 1995) como en invertebrados (Domingo y otros, 1998).

### Los genes del complejo Troponina en *Drosophila melanogaster*

El primer dato relevante en cuanto al complemento genético que produce los componentes del complejo Troponina es el número de genes implicados en vertebrados y en insectos (Tabla 2). Los vertebrados sólo poseen dos genes que codifican para la Troponina C y no poseen procesamiento alternativo, mientras que, como se ha establecido durante el trabajo de esta tesis, el número de genes TpnC en insectos llega incluso a seis en el caso del mosquito *A. gambiae* (Herranz, Mateos y Marco, Enviado). En cambio, aunque no se han detectado todas las isoformas posibles en vertebrados, se ha descrito que la TpnT y la TpnI están codificadas por tres genes cada una, y que además, poseen exones procesados alternativamente, mientras que los invertebrados sólo poseen una copia de cada gen. Estos genes están agrupados en el genoma del ratón y el humano por parejas, sugiriendo una coevolución de los genes de la TpnT y la TpnI (Barton y otros, 1999, Huang y Jin, 1999). Sin embargo la funcionalidad de los miembros de los pares no es homogénea. Un posible esquema de la diversificación de estos genes (figura 7) sugiere una duplicación ancestral paralela del gen de la TpnC y el cluster TpnT-TpnI para dar cabida a la diferenciación de los tejidos musculares de los vertebrados (Oota y Saitou, 1999), por un lado fibras esqueléticas rápidas y por otro las esqueléticas lentas y las cardíacas. En una segunda diversificación, el cluster lento/cardiaco de TpnT-TpnI se duplicó y cada gen se especializó independientemente en los dos tejidos. Los genes TpnC no se duplicaron en este segundo evento.

A principios de los noventa se descubrieron los genes de *D. melanogaster* que codificaban para la TpnT (Bullard y otros, 1988) y la TpnI (Barbas y otros, 1991). La secuenciación de las regiones no codificantes de los genes permitieron identificar exones que inicialmente habían sido omitidos (Barbas y otros, 1993, Benoist y otros, 1998). La figura 8A presenta la estructura de ambos genes extraída de los artículos citados anteriormente. Al igual que ocurre en los genes homólogos de mamíferos se puede localizar una región de variabilidad, por procesamiento alternativo, en la región 5' y en la región 3' terminal en el caso del gen de la TpnI. En el caso de la TpnT sólo se había descrito variabilidad en la región 5' (Benoist y otros, 1998).

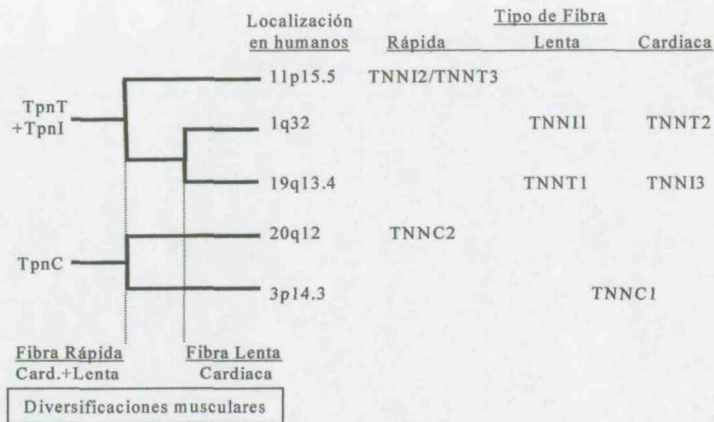


FIGURA 7. Esquema propuesto para la evolución de los genes Tpn en mamíferos. Los genes TpnT y TpnI aparecen siempre en parejas en los genomas de humanos y ratones. Utilizando la localización cromosómica de estos genes en humanos (Barton y otros, 1999) es posible inferir la coevolución de los componentes Tpn y asociarlo a la diversificación de los distintos tipos musculares de vertebrados.

	<i>Drosophila</i>	<i>Anopheles</i>	<i>Apis</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Pez Fugu</i>	Mamíferos
TpnT	1*	1*	1*	1*	3	3 SS*, FS*, C*
TpnI	1*	1*	1*	1*	3	3 SS*, FS*, C
TpnC	5 73F – Ia 47D – Ib 25D – II 41C – IIIa 41F – IIIb	6 AgCG55381 – I AgCG47362 – II AgCG51999 – IIIb1 AgCG51999-2 – IIIa AgCG52004 – IIIb2 AgCG52005 – IIIb3	5 AmTpnCI AmTpnCIIa AmTpnCIIb AmTpnCIIIa AmTpnCIIIb	2 TpnC1-pat10 TpnC2	4 Sk1, Sk2 C1, C2	2 FS, SS/C

TABLA 2. Número de genes que codifican los componentes del complejo Tpn en distintos organismos. Se observa un claro contraste en el número de genes que codifican para TpnT o TpnI en mamíferos frente al gen único en invertebrados. Del mismo modo sólo dos genes sin procesamiento alternativo codifican para la TpnC en mamíferos y, avanzamos en esta tabla, hemos localizado hasta seis genes de TpnC en el mosquito de la malaria. Los genes TpnC de tipo II se muestran en cursiva y los de tipo III en negrita. SS= slow skeletal (fibra lenta), FS=fask skeletal (Fibra rápida), C=Cardíaca (Fibra Cardíaca), \*=Detectadas distintas isoformas de procesamiento alternativo.

La región variable 5' se obtiene por el procesamiento de exones alternativos, en cambio la región variable 3' se obtiene por procesamiento de exones mutuamente excluyentes (todos los transcritos de la TpnI contienen por un lado uno de los exones de tipo 6, y por otro el exón 9 o el exón 10). En esta memoria presentaremos un nuevo exón de tipo 10 para la TpnT que completa la estructura del gen de la TpnT con la región variable 3' que no había sido descrita.

Los genes de la Troponina C en *D. melanogaster* han sido más esquivos. En el primer intento de describirlos (Fyrberg y otros, 1994), solo se localizaron tres genes. Se estableció su estructura génica, su localización cromosómica (41C, 47D y 73F), dato que se usó para bautizar estos genes, y su patrón de expresión durante el desarrollo de *Drosophila* (ver siguiente apartado). Tras la secuenciación del genoma completo de *D. melanogaster* (Adams y otros, 2000, Celniker y otros, 2002) varios laboratorios tuvimos la oportunidad de localizar nuevos genes que codifican para la TpnC. En el año 2003 tanto el laboratorio de la Dra. Bullard (Qiu y otros, 2003), como el nuestro en colaboración con el laboratorio del Dr. Cripps (Herranz y otros, 2003), describimos independientemente la existencia de un cuarto gen, denominado 41F por su localización cromosómica. En nuestro laboratorio hemos localizado adicionalmente un quinto gen, denominado 25D que será descrito en esta memoria.

En la figura 8B se pueden apreciar las estructuras génicas de los cuatro genes descritos previamente, así como la nueva nomenclatura que hemos introducido tras nuestra publicación (esta nomenclatura se razonará en los resultados, pero se avanza aquí para facilitar la lectura de esta memoria). Se basa principalmente en la conservación de la secuencia primaria, el patrón de expresión y las características funcionales de la proteína, lo que permite aplicarla a las TpnCs de otros insectos (Herranz, Mateos y Marco, Enviado). Uno de los aspectos más importantes que se discutirá en este trabajo, y que se obtiene a partir de la estructura génica de los genes de la TpnC, es la posición relativa de los intrones. Había sido descrito que los genes de la TpnC en la línea evolutiva de los vertebrados (Yuasa, Cox y Takagi, 1998, Yuasa y Takagi, 2000, 2001) mantienen altamente conservada la posición relativa de los intrones con respecto a las cuatro manos EF de la proteína. Veremos cómo en los genes TpnC de invertebrados esto no se cumple de una manera estricta, lo que nos será útil para seguir la historia evolutiva de estos genes en insectos.



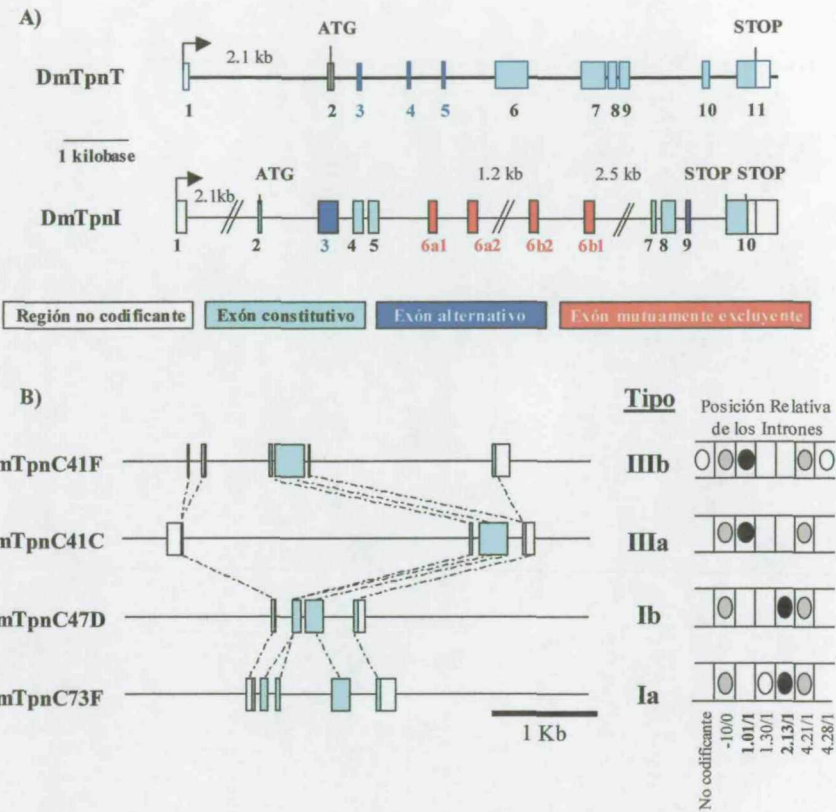
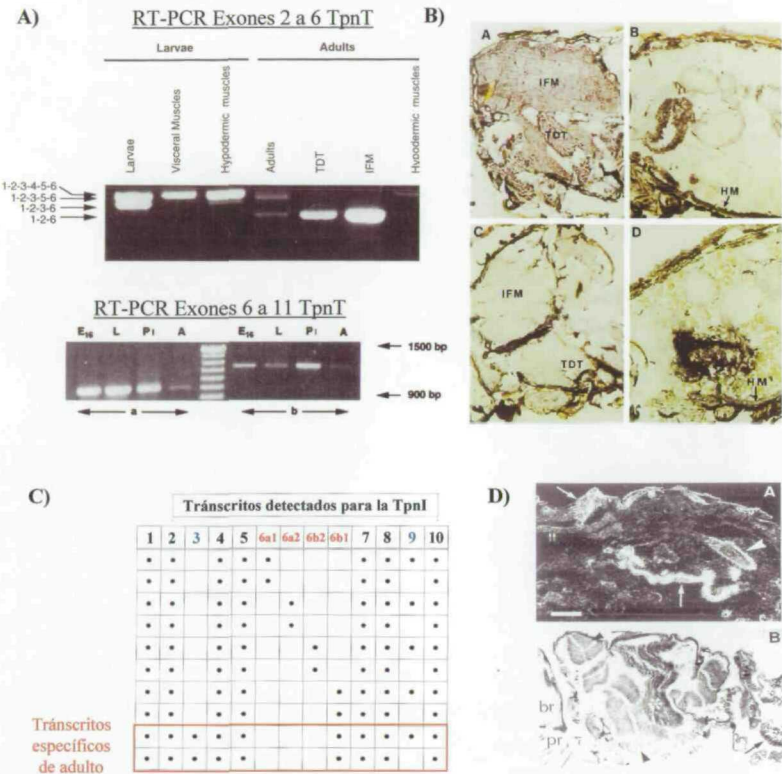


FIGURA 8. Estructuras de los genes Troponina en *Drosophila*. Se muestran las estructuras de los genes TpnT (Benoist y otros, 1998), TpnI (Barbas y otros, 1993) y TpnC (Fyrberg y otros, 1994, Qiu y otros, 2003, Herranz y otros, 2003) sin incluir los nuevos elementos descritos en esta memoria. En los genes TpnT y TpnI (A), se destacan las regiones variables que generan las diferentes isoformas por procesamiento alternativo de exones. Para los genes TpnC (B) se indica mediante líneas de puntos la conservación en la estructura exónica. A la derecha se muestra la nueva nomenclatura introducida por nosotros para estos genes así como la posición relativa de los intrones en los genes TpnC. Los intrones marcados con un círculo gris están conservados en los cuatro genes, los intrones marcados en negro son específicos del tipo al que pertenece el gen, y los blancos son variables. La nomenclatura utilizada para los intrones se describe en la tabla 6 (página 56) y fue introducida por Nakayama y Kretsinger (1993).

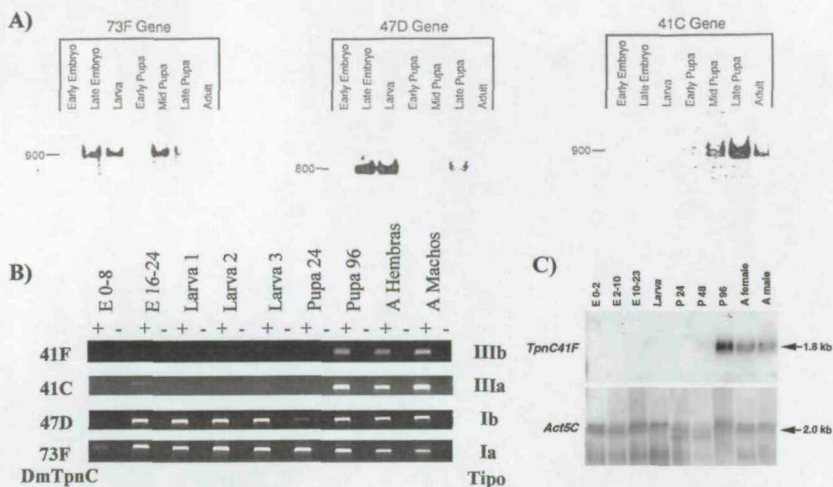
### Patrón de Expresión de los genes Troponina en *Drosophila*.

Los trabajos citados anteriormente contenían información sobre la expresión de los genes Troponina en los diferentes músculos de *Drosophila* durante su desarrollo y en el adulto. En la figura 9 se muestran los patrones de expresión de la TpnT (Benoist y otros, 1998) y de la TpnI (Barbas y otros, 1993). Tanto las RT-PCRs como las hibridaciones *in situ* muestran un patrón de expresión diferencial para los transcritos de TpnT con diferentes combinaciones de los exones 3 a 5, siendo la isoforma que carece de todos estos exones (E2-6) la que se expresa en los músculos torácicos de vuelo. Con respecto a la región 3' de los transcritos de la TpnT se observó una banda única (exones 6 a 11) considerándose que esta región no sufría ningún fenómeno de procesamiento alternativo. Aunque en Barbas y otros (1993) no se muestran los resultados directamente, se presenta una tabla en la que se considera que el exón 3 es específico de adultos mientras que todas las demás isoformas posibles (combinaciones de los exones 6 mutuamente excluyentes y el exón 9 alternativo) se expresan tanto en larvas como en adultos. Sin embargo en experimentos de hibridación *in situ* se detectan distintos niveles de expresión específicos de tejido muscular en los transcritos que contienen los distintos exones 6, siendo el exón 6b1 específico de IFMs.

El patrón de expresión obtenido por análisis de Northern blot de los primeros tres genes de la TpnC descubiertos por Fyrberg y otros (1994) se muestra en la figura 10A. Los genes de 47D y 73F tienen una expresión mayoritaria en los músculos larvarios, aunque 73F también se expresa fuertemente durante la pupación. El gen 41C empieza a expresarse solamente al final de la pupación. En la figura 10B mostramos el patrón de expresión obtenido por RT-PCR incluido el cuarto gen (41F) descrito recientemente (Herranz y otros, 2003, Qiu y otros, 2003). El experimento de Northern blot correspondiente al gen 41F se muestra en la figura 10C, y corrobora su expresión exclusiva en los músculos del adulto al igual que el gen 41C. Adelantándonos a los resultados de esta memoria, y por hacer más sencillo el seguimiento de la nomenclatura de los genes TpnC, por sus secuencias primarias y patrones de expresión denominaremos de ahora en adelante genes de tipo I a los de expresión larvaria y tipo III a los de expresión exclusiva de adultos, utilizando una letra para diferenciar el patrón de expresión más general (a) o el más específico (b). De esta manera las correspondencias serían, DmTpnCIa (73F), DmTpnCIb (47D), DmTpnCIIIa (41C) y DmTpnCIIIb (41F).



**FIGURA 9.** Patrones de expresión de los genes TpnT (A y B) y TpnI (C y D) por RT-PCR e hibridaciones *in situ*. **A)** Usando oligonucleótidos específicos para los exones 2 y 6 se obtuvieron los tránscrios variables en la región 5' del gen TpnT. Usando cebadores para los exones 6 y 11 se obtuvo una única banda (Benoist y otros, 1998). **B)** Detección por ribosondas (exón 6 en los paneles A (tórax) y B (abdomen), o el exón 3 y el 5 en los paneles C (tórax) y D (abdomen)) de los tránscrios de la TpnT. La sonda con los exones 3 y 5 no reconoce los IFMs y TDTs, pero si los músculos hipodérmicos. **C)** Tabla resumen con todos los tránscrios detectados para la TpnI en *Drosophila*. Sólo las isoformas que contienen el exón 3 son específicas de adulto, el resto son detectables tanto en larvas como en adultos. **D)** Hibridación *in situ* con sondas específicas de los exones 6a1 y 6b1 de la TpnI (Barbas y otros, 1993). El exón 6a1 se expresa en los músculos hipodérmicos abdominales y el 6b1 es específico de los músculos torácicos (IFM marcado con un asterisco).



**FIGURA 10. Patrón de expresión durante el desarrollo de los genes TpnC en *Drosophila*.** A) Patrón de expresión obtenido por Northern blot para los genes 41C, 47D y 73F (Fyrberg y otros, 1994). B) Patrón de expresión detectado por RT-PCR de los genes 41C, 41F, 47D y 73F (Herranz y otros, 2003). C) Patrón de expresión por Northern blot del gen 41F (Herranz y otros, 2003). Los genes 41C y 41F (Tipo III) no comienzan a expresarse hasta el final del desarrollo pupal, siendo específicos de músculo adulto. Los genes 47D y 73F (Tipo I) se expresan durante todo el desarrollo, siendo el gen 47D más específico de músculo larvario que el gen 73F.

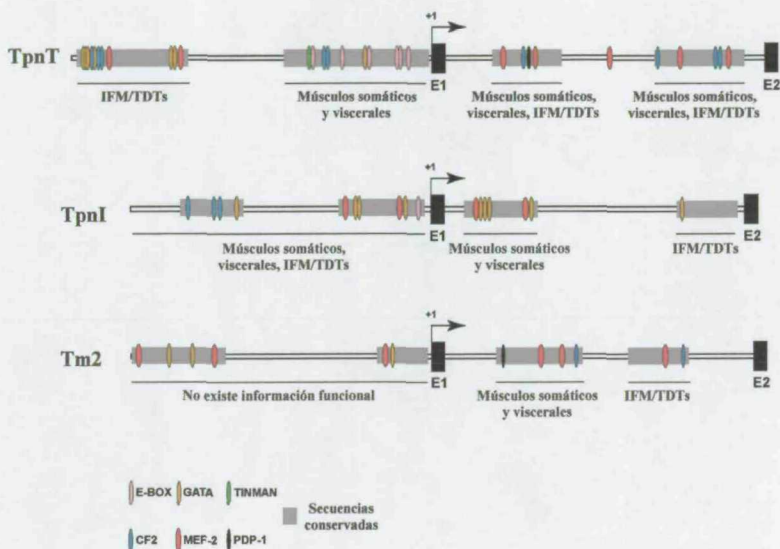
### Regulación de la expresión de los genes Troponina en *Drosophila*

Una vez conocida la estructura génica y el patrón de expresión de los genes Tpn, los laboratorios implicados en su descripción han empezado a estudiar la regulación de la transcripción de los genes de la DmTpnT (Mas, García-Zaragoza y Cervera, En prensa) y la DmTpnI (Marín, Rodríguez y Ferrús, En prensa). En ambos casos, y como ocurría con otros genes musculares en *Drosophila*, como la paramiosina (Arredondo y otros, 2001), existen dos módulos que controlan la expresión de los genes, uno en el promotor del gen (URE, del inglés Upstream Regulatory Element) y otro en el intrón 1 (IRE, Intron Regulatory Element) que además tiene un tamaño inusualmente grande (varias kilobases). Estos elementos controlan independientemente la expresión de los genes en todos los tejidos musculares, conteniendo secuencias de unión para factores de



transcripción conocidos y regiones conservadas entre distintas especies de *Drosophila* que podrían estar implicadas en la regulación específica de cada tejido muscular (Mas, García-Zaragoza y Cervera, En prensa).

En la figura 11 aparecen los elementos localizados en las regiones reguladoras de la transcripción de los distintos componentes del filamento fino analizados. Un esfuerzo equivalente no ha sido realizado en los genes de la TpnC hasta ahora.



**FIGURA 11. Motivos conservados en los promotores e intrones 1 de los genes *TpnT*, *TpnI* y *Tm* en *Drosophila*.** Las regiones conservadas en diferentes especies de *Drosophila* están marcadas en gris y los motivos de unión para factores de transcripción conocidos están indicados como se explica en la leyenda. Algunos de los factores de transcripción localizados son Tinman (homólogo de NKX2.5 en vertebrados), MEF-2, PDP-1 o CF2. También se muestran las cajas E, secuencias de unión para factores de tipo bHLH. Figura obtenida de Mas, García-Zaragoza y Cervera (En prensa).

## OBJETIVOS

Nuestro laboratorio ha estado interesado en las proteínas musculares de *Drosophila* desde hace más de quince años. Más recientemente, y tras la popularización de las técnicas de biología molecular, ese interés comenzó a focalizarse también en los genes que traducían esas proteínas y en su regulación. Desde que en el año 2000 se publicó el genoma de *Drosophila melanogaster* y se promovieron diferentes iniciativas para la secuenciación de los genomas de otros organismos, en concreto de algunos insectos como *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera* y *Drosophila pseudoobscura*, hemos alcanzado un momento óptimo para completar la caracterización génica de las Troponinas. Hemos desarrollado un trabajo de investigación con la intención de refinar, ampliar y sobretodo integrar la información obtenida sobre estos genes. Los objetivos específicos del trabajo de investigación objeto de esta memoria son:

- Establecer definitivamente el número de genes que integran el complemento génico de la TpnC en *D. melanogaster* y describir su patrón de expresión.
- Caracterizar y clasificar los genes TpnC por sus secuencias primarias, la posición relativa de sus intrones y las propiedades de sus manos EF.
- Ampliar y corroborar la clasificación de los genes TpnC en varias especies de insectos, *D. pseudoobscura*, *D. subobscura*, *D. virilis*, *A. gambiae* y *A. mellifera*, para reconstruir su historia evolutiva.
- Establecer definitivamente cuántos exones alternativos están implicados en los transcritos de la TpnI y la TpnT en *D. melanogaster* y determinar su patrón de expresión.
- Analizar las secuencias de los genes TpnT y TpnI, especialmente en sus regiones variables por procesamiento alternativo.
- Extender el análisis evolutivo a los genes TpnT y TpnI buscando elementos que sugieran una coevolución de los genes del complejo Troponina.
- Proponer un modelo funcional integrador del repertorio de isoformas de los genes Troponina en los distintos tipos musculares de *Drosophila*, con especial interés en los músculos indirectos de vuelo por su contracción asincrónica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Organismos utilizados

Como cepa salvaje de *Drosophila melanogaster* se utilizó la cepa Oregon R. Los ejemplares de *D. subobscura* fueron proporcionados por la Dra. Rosa de Frutos (Valencia) y los de *D. virilis* por el Dr. Manuel Calleja (Madrid). También se ha incluido en este estudio la especie *D. pseudoobscura* de la que sólo hemos utilizado las secuencias genómicas publicadas por el Proyecto de Secuenciación del Genoma Humano mediante BLAST en el servidor web del Baylor College of Medicine (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast/>).

Las tres especies obtenidas de *Anopheles* (*A. gambiae*, *A. dirus* y *A. quadrimaculatus*) fueron pedidas al “Malaria Research and Reference Reagent Resource Center” (<http://www.malaria.mr4.org/>). Desgraciadamente no se ha podido extraer RNA de los mosquitos proporcionados con calidad suficiente para nuestros análisis por lo que sólo se presentan los datos de la especie con el genoma secuenciado (*A. gambiae*).

En el caso de los organismos de la familia Hymenoptera, diferentes estadios del desarrollo y adultos de *Apis mellifera* fueron proporcionados por Eulalio Castells Criado (Comunidad Autónoma de Madrid) y José Vicente Alonso, y recogidos de las colmenas de este último en El Vellón (Madrid) en el verano de 2003. Adultos de una especie silvestre del genero *Apis* fueron recogidos en las mismas fechas en el campus de la Facultad de Medicina de la UAM.

### Disección de adultos y obtención de diferentes estadios del desarrollo

Los adultos de las tres especies de *Drosophila* y las dos especies de *Apis* utilizadas fueron inicialmente diseccionados separándolos en cabezas, tóraces y abdómenes. Para ello se sumergieron en acetona enfriada con nieve carbónica para facilitar la disección. Dadas las especiales características de los músculos indirectos de vuelo, se diseccionaron los músculos torácicos de *D. melanogaster*, separando los IFMs de los músculos del salto (TDTs). En el caso de la especie silvestre del genero *Apis*, dado su mayor tamaño, fue posible discriminar también entre músculos IFMs dorsoventrales y dorsolongitudinales. Para la disección de músculos específicos fue

necesario mantener los adultos al menos dos semanas en acetona enfriada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para deshidratar los insectos y facilitar la separación de los paquetes musculares individuales.

Para estudiar el patrón de expresión de los genes Troponina durante el desarrollo de *Drosophila* se obtuvieron las fracciones embrionaria (0 a 24 horas), larvaria temprana (24 a 48 horas), larvaria tardía (correspondiente al tercer estadio larvario), pupa temprana (0 a 24 horas desde la pupación) y pupa tardía (se puede observar el adulto completamente formado en el interior de la pupa con los ojos claramente pigmentados). En el caso de *A. mellifera* se recogieron estadios del desarrollo directamente de un panal. Separamos las larvas tempranas (unos 4 días de desarrollo, localizadas en la celda del panal aún sin recubrir) de las larvas tardías (mayor tamaño y con la celda cerrada, 9 días de desarrollo comenzando la fase de ninfa). También obtuvimos dos estadios pupales (la abeja se está desarrollando dentro de la celda) discriminando entre las abejas sin pigmentación (unos 12 días de desarrollo, final de la fase de ninfa), de las abejas con los ojos claramente pigmentados y con la morfología del adulto completamente formada tras unos 15-18 días de desarrollo (Toumanoff, 1951). También se pudieron obtener individuos jóvenes (recogidos en el momento de la eclosión) e individuos maduros (al menos una semana después de la eclosión).

### **Extracción de ácidos nucleicos, retrotranscripción y PCR**

Las extracciones del RNA de las distintas fracciones obtenidas se realizaron utilizando el producto comercial TRIZOL Reagent® (Gibco). El DNA genómico fue obtenido usando una disolución de homogenización con Tris-HCl 10 mM pH 7.0, 0.5% SDS y NaCl 60 mM seguida de una purificación por fenolización (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989). Los RNAs obtenidos fueron cuantificados, y utilizando 2  $\mu\text{g}$  de RNA total y 1  $\mu\text{g}$  del cebador poli-dT, fueron retrotranscritos con AMV Retrotranscriptasa® (Promega). Controles negativos (sin enzima) fueron realizados simultáneamente.

El patrón de expresión de los diferentes genes fue detectado utilizando parejas de oligonucleótidos específicos para PCR (Tabla 3). Las reacciones de amplificación se realizaron con 30-35 ciclos de amplificación ( $94^{\circ}\text{C}/30$  segundos,  $55-60^{\circ}\text{C}/45$  segundos,  $72^{\circ}\text{C}/45$  segundos) con la polimerasa termoestable DyNAzyme® (Fynnzimes) en un termociclador Gene Amp 2700 (PE-Applied biosystem). Las amplificaciones de DNA genómico se realizaron ampliando los tiempos de hibridación y elongación hasta un minuto. Las PCRs del gen TpnI se realizaron añadiendo a la mezcla de reacción DMSO al 2.5% para minimizar las estructuras secundarias que podrían interferir en la reacción.



Fragmento amplificado	Cebador Directo (5'-3')	Cebador Invertido (3'-5')
DmTpnC1a	5'- TAC ACC CGA GCA GAT CGC CGT -3'	5'- ACT CGC CAG TCA TCA TCT CCA -3'
DmTpnC1b	5'- GAC GAA GAC CTG ACC CCC GAG C -3'	Idem
DvTpnC1b	5'- GGC AGT ATC CCC ACC GAA AT-3'	5'- GGC CTC ATC ATC CTC CTC TA-3'
DmTpnC1II	5'- ATG GAC ATC ATG CGC AAG GCA TTC-3'	5'- ACT CGC CAG TCA TCA TCT CCA -3'
DmTpnC1IIIa	5'- ATG AAT TGA CTA AGG ARC ARA C -3'	5'- CAT AAA TTC ATC AAA RTC NAC -3'
DmTpnC1IIIb	5'-GCT TTC GAC CAG GAC GGT GCA GGA - 3'	5'- GAA ATT GAT GCG GAT GGA TCC GGT -3'
AmTpnC1	5'- TGA CAG GGA GAA AAG TGG TAG -3'	5'- CTG TTA ATT GAT CGT CCA GTT C -3'
AmTpnC1IIa	5'- TTC CGA CTT GAA TGC TTT GAT -3'	5'- ATT TAT TCT CCA GTC ATC ATT TCC -3'
AmTpnC1IIb	5'- GAA GGA AAA AGT GAG GAC GA -3'	5'- AAT AAT AGG AGG AAG AGA GTG TG -3'
AmTpnC1IIIa	5'- GAC AAA AAA GGT AGT ATC GGT -3'	5'- CGG TCA TAA CTT CCA TAA ATT -3'
AmTpnC1IIIb	5'- GAG ATT CAA CTC AGC AAA GAT -3'	5'- GGT GAT AAT TTA GCC TGT CAT -3'
TpnT E1-E6	5'-TAG TCG AAC CGC AGC ATT-3'	5'-CAC GCC TGC ATC CTT CTT-3'
TpnT E6-E11	5'-GGA GAG GGC GAT CCA GAG-3'	5'-CTC GTC CTC CTC ATC TTC-3'
TpnT E6-E10A1	Idem	5'-GTT TCC GCA TAG ACC GTA TTA T-3'
TpnT E6-E10A2	Idem	5'-TTC TTG CCA GGT CTT TTC TAA G-3'
TpnT E6-E10B1	Idem	5'-CTT CTC GTT CGA GTC CTT GG-3'
TpnT E6-E10B2	Idem	5'-GGT GTA TTG CTC CTT CTT CTC G-3'
TpnI E2-E9	5'-ACC AAA AAC ACA AAT CAA AAT G-3'	5'-GGC ATC TTT TAT CTT TTT TC-3'
TpnI E2-E6a1	Idem	5'-TGC GTT TAA CAA CAT ACT CA-3'
TpnI E2-E6a2	Idem	5'-TAC TTT TCG GAC TCC AGT TT-3'
TpnI E2-E6b1	Idem	5'-ATT TCT GGC CTT CAC AAA TA-3'
TpnI E2-E6b2	Idem	5'-GTA TAC GCG TTG CCA ATA TT-3'
TpnI E2-E10	Idem	5'-CCT CAA CCT CCT CCT TCA CCT T-3'
TpnI E8a-E10	5'-TGA AGA AGG TCT CCA AAT AC-3'	Idem

**Tabla 3: Oligonucleótidos usados como cebadores en las reacciones de PCR.** En el caso de los genes TpnI y TpnT se indican los exones a partir de los cuales se realiza la amplificación. Excepto para el gen DvTpnC1b los mismos cebadores se pueden utilizar para todas las especies de *Drosophila*.

### Clonaje y secuenciación

Las reacciones de PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa de porcentaje variable dependiendo del tamaño esperado de las amplificaciones (0.6 a 1.5 %). Las bandas fueron extraídas con el kit comercial Concert rapid Gel Extraction® (Gibco), clonadas en el vector pGEM-T easy ® (Promega) y transformadas en la cepa DH5α de *E. coli*. Después de ser seleccionados los clones, se purificaron los plásmidos con el kit Wizard Plus SV minipreps ® (Promega) seguido de fenolización si la calidad de los plásmidos no era suficiente para secuenciación. Los insertos fueron secuenciados utilizando cebadores comerciales (SP6 y T7) en el servicio de secuenciación automática del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

### Expresión por Northern blot e hibridación *in situ*

Los experimentos de Northern blot e hibridación *in situ* de los nuevos genes de la TpnC (TpnC41F o TpnCIIIb y TpnC25D o TpnCII) se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Cripps (Herranz y otros, 2003). Una vez establecido que el gen TpnCII formaba parte del repertorio de Troponinas C de *Drosophila* y cuál era el inicio y final de la transcripción (determinado por RACE utilizando el kit FirstChoice RLM-RACE® de Ambion, ver Resultados) generamos una sonda para realizar estos experimentos de expresión. Se utilizaron unos oligonucleótidos próximos a los límites del RNA mensajero localizados en las regiones 5' (5'-AAC GCA GTT GGA ACG CAT TG-3') y 3' (5'-TAT AAT TAA ACC CAA AAG CTC G-3') no traducidas para amplificar la sonda que fue clonada como se comentó anteriormente.

Esta sonda fue utilizada en experimentos de Northern blot siguiendo el método estándar (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989) utilizando la Actina 5C citoplasmática como control de carga. Los experimentos de hibridación *in situ* se realizaron como se describe (O'Neill y Bier, 1994, Lovato y otros, 2001).

### Herramientas bioinformáticas y números de acceso de secuencias

Las secuencias publicadas en el genbank fueron obtenidas y comparadas preliminarmente utilizando el NCBI Blast (Altschul y otros, 1997). Las secuencias fueron analizadas en el laboratorio utilizando los programas Gene Jockey II® y Bioedit® (Hall, 1999). Las secuencias genómicas de las especies *Apis mellifera* y *Drosophila pseudoobscura* se ensamblaron apartir de fragmentos obtenidos por BLAST (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/blast/>) en el Baylor Collage of Medicine. Secuencias de expresión (EST) se obtuvieron del TIGR Gene Indices (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>).

Las comparaciones de secuencia y la inferencia de funcionalidad de las manos EF de las diferentes Troponinas C se realizaron atendiendo a la conservación de la secuencia canónica de manos EF obtenida de la CaBP (Calcium Binding Proteins) data library (Marsden, Shaw y Sykes, 1990), y basándonos en la funcionalidad previamente descrita de manos EF en TpnCs de invertebrados (Allhouse y otros, 1999, Ojima y otros, 2000, Ueda y otros, 2001, Qiu y otros, 2003).

Las predicciones de estructura tridimensional de las Troponinas C fueron realizadas a través del servidor de Expasy usando "the first approach method" ([http://swissmodel.expasy.org/SM\\_FIRST.html](http://swissmodel.expasy.org/SM_FIRST.html)) con diferentes combinaciones de moldes tridimensionales conocidos de TpnC de vertebrados. Los resultados fueron

analizados y representados con el SwissPdbViewer (Guex y Peitsch, 1997, Schwede y otros, 2000) y Rasmol v2.7.2.1. Las predicciones de estructuras secundarias de las Troponinas T y Troponina I fueron realizadas también a través de ExPasy con el método PSIPRED (Jones, 1999, McGuffin, Bryson y Jones, 2000).

La búsqueda de secuencias conservadas en las regiones candidatas a regular la transcripción de los genes TpnC se realizó como se describe (Mas, García-Zaragoza y Cervera, En prensa) con el programa GeneJockey II. Las secuencias de unión de los factores de transcripción buscados manualmente son: MEF2, C/TTAWWWWTAA/G o CCAAAAATAA/G; TINMAN, TCAAGTG; CF2, A/GTATATA/GTA; PDP1, AAAA/GTGTTA/GTAA/T; Caja E, CANNTG. Búsquedas automatizadas para secuencias de tipo MEF2, MyoD, Tinman y factores GATA se realizaron con el programa MatInspector v2.2 (Quandt y otros, 1995) basado en la base de datos Transfac 4.0 (Wingender y otros, 2000).

Todas las secuencias utilizadas en este trabajo han sido depositadas en las correspondientes bases de datos. En la Tabla 4 aparecen tabuladas todas las secuencias de los genes Troponina que hemos utilizado extensivamente. Las secuencias obtenidas en nuestro laboratorio por secuenciación han sido depositadas en la base de datos del EMBL como secuencias primarias. Las secuencias obtenidas a partir de los datos de secuenciación de proyectos genoma (*D. pseudoobscura*, *A. gambiae* y *A. mellifera*) han sido analizadas y anotadas por nosotros, y posteriormente enviadas a la sección TPA (Third Party Annotation) de las bases de datos del EMBL (genbank).

### Árboles filogenéticos

La comparación directa de todas las secuencias utilizadas en esta memoria resulta una tarea inabordable. Para superar este obstáculo hemos introducido los árboles filogenéticos como herramienta para estudiar las relaciones de secuencia entre estos genes. Las directrices básicas que se han utilizado para analizar los resultados de los árboles filogenéticos aparecen explicadas de una forma clara y simplificada en Baldauf (2003b). Utilizamos el programa Treeview® (Page, 1996) para analizar y representar los árboles filogenéticos.

La interpretación de un árbol filogenético debe ser muy rigurosa para no hacer falsas comparaciones entre secuencias que no están bien relacionadas. Se discutirán a continuación cuáles son algunos de los problemas más comunes (Sanderson y Shaffer, 2002) en la interpretación de los árboles evolutivos y cómo resolverlos:



Números de Acceso a secuencias del Genbank							
	TpnC Ia-73F	TpnC Ib-47D	TpnC II-25D	TpnC IIIa-41C	TpnC IIIb-41F	TpnT	TpnI
<i>D. melanogaster</i>	CG7930 NM079398	CG9073 NM057620	CG6514 <b>AY283601</b>	CG2981 NM078895	CG12408 <b>AY283602</b>	CG7107 <b>AY439172</b>	CG7178 X58188
<i>D. pseudoobscura</i>	<b>BK001457</b>	<b>BK001456</b>	<b>BK001458</b>	<b>BK001460</b>	<b>BK001459</b>	<b>BK001654</b>	<b>BK001655</b>
<i>D. subobscura</i>	AY292253	AY292251	AY292255	AY292259	AY292257	1-AY439173 2-AY439174 3-AY439175 4-AY439176 5-AY439177	b1- AY439180 b2- AY439181 a1- AY439182
<i>D. virilis</i>	AY292254	AY292252	AY292256	AY292260	AY292258	AY439178 <b>AY439179</b>	b1- AY439183 a1- AY439184
<i>A. gambiae</i>	AgCG55381 (AgTpnCI)		AgCG47362 (AgTpnCII)	AgCG51999-2	AgCG51999 AgCG52005 AgCG52004	AgCG47410	AgCG49850
<i>Cluster Tipo III BK001613</i>							
Otros insectos	AJ512941 (LiTpnC3)		AJ512939 (LiTpnC4)	AJ512940 (LiTpnC1)		AF133520 (PaTpnT)	AB051079 (HiTpnI)
	<i>AmTpnCI</i> <b>BK001609</b>		<i>AmTpnCIIa</i> <b>BK001610</b> <i>AmTpnCIIb</i> <b>BK001611</b>	<i>Cluster Tipo III BK001612</i> ( <i>AmTpnCIIIa</i> y <i>IIIb</i> )		AF133521 (LpTpnT)	

**TABLA 4. Números de acceso de las secuencias de los genes Troponina en insectos.** Adicionalmente queremos introducir también el número de acceso de la secuencia (cDNA) de la TpnC41F en *D. silvestris* (AF047329). En el caso de *D. melanogaster* proporcionamos dos números, el número del gen de Celera y la secuencia con evidencia de expresión de los transcritos. Las secuencias de nucleótidos de *D. pseudoobscura* y *Apis mellifera* están disponibles en la sección TPA del DDBJ/EMBL/GenBank y fueron obtenidas de los proyectos de secuenciación en curso en el Baylor College of Medicine (version a 27-02-2003, revisada el 26-05-2003). Las secuencias enviadas por nosotros al genbank como secuencias primarias aparecen en negrita y las secuencias anotadas por nosotros (TPA) en cursiva. Los cinco números de acceso proporcionados para la TpnT de *D. subobscura* se corresponden con los cinco transcritos localizados. Los dos números de acceso proporcionados para la TpnT en *D. virilis* se corresponden con la región 5' y la región 3' de un clón genómico secuenciado por nosotros en esta especie (Benoist y otros, 1998), separados ambos fragmentos por una pequeña región no secuenciada de unos 100 bp. Los números de acceso proporcionados para la TpnI en *D. subobscura* y *D. virilis* corresponden a los transcritos localizados con los diferentes exones 6. Otros genes Troponina (cDNA) utilizados en este estudio fueron obtenidos de *Lethocerus indicus* para la TpnC (un hemíptero (Qiu y otros, 2003)), *Periplaneta americana* y *Libellula pulchella* para la TpnT (cucaracha, un dictióptero y la libélula, un odonato (Marden y otros, 1999, Marden y otros, 2001)) y *Haemaphysalis longicornis* para la TpnI (la pulga, un acaro (You y otros, 2001)).



- 1- El número de secuencias utilizadas y la distancia evolutiva que las separa es muy importante para la validez de estos análisis. En este trabajo se ha dispuesto de un número relativamente alto de secuencias con un margen de variabilidad amplio, desde 5 millones de años (*D. melanogaster* con *D. pseudoobscura*) hasta 300 millones de años que separan los dípteros de los himenópteros. Trabajos menos exhaustivos en este sentido (Qiu y otros, 2003) han desestimado este factor, relacionando genes que realmente no son ortólogos y se relacionan por el “artefacto de atracción del brazo largo”, es decir, dos secuencias alejadas del resto aparecen relacionadas en el árbol. Una buena solución para este problema es introducir una secuencia que esté alejada de todas las demás (outgroup).
- 2- La utilización de un único algoritmo para la generación de un árbol no es suficiente para garantizar su validez. Nosotros hemos utilizado los dos tipos básicos de algoritmos. Uno de ellos basado en matrices de distancia (método algorítmico, en nuestro caso usamos el algoritmo Fitch-Margoliash, incluido en el programa Bioedit) y el otro basado en el “vecino más próximo” (Phylogendrom v0.8d, beta 1999 y algoritmo ClustalW v1.75 (Thompson, Higgins y Gibson, 1994)).
- 3- El segundo algoritmo nos permite adicionalmente evaluar la calidad de los resultados obtenidos mediante el “bootstrap”. El algoritmo selecciona partes aleatorias de la muestra que le hemos proporcionado y ensaya los posibles árboles filogenéticos obtenibles. Nos devuelve el árbol filogenético que ha aparecido mayor número de veces, y la frecuencia en porcentajes de cada rama del mismo que se mantiene en otros árboles (bootstrap). Si el valor de bootstrap es mayor al 65% podemos tener la certeza de que esa rama está correctamente ubicada en el árbol, en caso contrario no podemos saber exactamente cómo se han dividido esas ramas. Nosotros hemos realizado 1000 iteraciones de cada árbol filogenético para verificar estos valores.
- 4- Un árbol filogenético sólo refleja las distancias evolutivas que separan dos secuencias cuando estas no han alcanzado el punto de saturación, es decir, que se hayan acumulado variaciones sobre una secuencia que ya había cambiado (A->T->A, parecería más próximo y realmente hubo dos mutaciones). Veremos como los genes de la Troponina C han alcanzado ese punto de saturación incluso en comparaciones dentro del género *Drosophilidae*.

### Producción y testado de anticuerpos

Los anticuerpos anti-TpnI se generaron por inmunización de un conejo con una proteína de fusión integrada por la isoforma de menor peso molecular de la TpnI (no contiene la región correspondiente a los exones 3 y 9) seguida de la proteína de unión de maltosa (MBP). Las construcciones se realizaron utilizando oligonucleótidos específicos para la TpnI con dianas de restricción para que, al insertar el fragmento amplificado en el vector pMALc, mantuviera la fase de lectura de la MBP. Clones con la fase de lectura correcta fueron inducidos con IPTG 100mM para sobreexpresar la proteína y se observó el resultado por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE, (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989)). El clon con mayores niveles de expresión fue crecido masivamente y la proteína de fusión cortada del gel de acrilamida (agente inmunogénico) y homogenizada con Coadyuvante de Freund (F-5506 Sigma©). Se realizó una inmunización semanal del conejo seguida de un testado del suero para verificar la inmunoreactividad del mismo por Western blot contra la propia proteína de fusión y un extracto de proteínas de cangrejo. A la séptima semana se consideró que era el momento óptimo para sacrificar el animal y obtener el suero, que fue purificado con un filtro millipore de 25  $\mu$ m (Acrodisc ®), alícuoteado y mantenido a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Los ensayos de actividad del suero se realizaron con muestras de *Drosophila* o cangrejo homogenizadas en tampón glicerolado modificado de York (White, 1983), seguida de centrifugación. El precipitado (libre de proteínas citoplásmicas) se resuspendió en un buffer con urea 4M para solubilizar las proteínas del filamento fino. Las muestras se desarrollaron en geles de acrilamida monodimensionales (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989) y en geles bidimensionales con anfolitos inmovilizados (siguiendo instrucciones del fabricante, Amersham Pharmacia Biotechnology, IPGphor Isoelectric Focusing System) y el suero se utilizó con diluciones de 1:200 a 1:2000, siendo el óptimo 1:1000.

### Tinción inmunocitoquímica de embriones

Los embriones fueron decorionizados con lejía comercial al 50% y fijados utilizando paraformaldehído (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989). La inmunocitoquímica se realizó siguiendo protocolos convencionales (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989) con una dilución 1:200 del suero anti-TpnI o anti-TpnC y 1:500 de anti-TpnT. Se utilizó un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, por lo que se utilizó DiaminoBencidina y peróxido de hidrógeno para el revelado.

## RESULTADOS

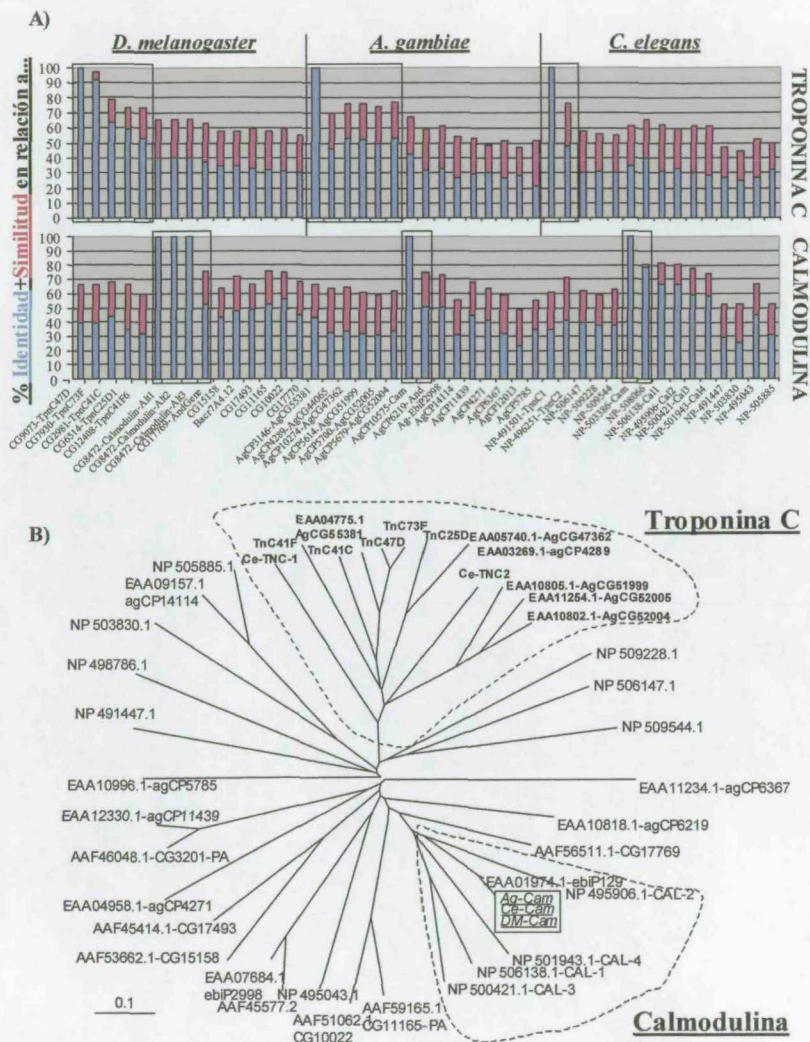
### Localización de los genes TpnC en los genomas de insectos

Como se ha descrito en la introducción, cuando se localizaron los tres primeros genes de la troponina C en *Drosophila* (Fyrberg y otros, 1994) quedaban dudas de que este fuera el repertorio completo de genes que codificaban para esta proteína. Nuestro primer objetivo, una vez completados los proyectos de secuenciación de un nemátodo (*C. elegans* (1998)) y dos dípteros (*A. gambiae* (Holt y otros, 2002) y *D. melanogaster* (Adams y otros, 2000)) fue localizar todos los posibles genes de la TpnC en estos organismos.

Se seleccionó la isoforma más conservada de TpnC en *Drosophila* (DmTpnCIIb) para localizar el gen ortólogo en *Anopheles* (AgCG55381, AgTpnCI) y *Caenorhabditis* (TpnC1). Los productos de estos genes fueron utilizados en un pBLAST para localizar las proteínas con mayor similitud a la Troponina C en cada organismo. En la figura 12A se muestran las identidades y similitudes encontradas entre la Troponina C seleccionada o la Calmodulina y a las 15 proteínas con mayor puntuación en el pBLAST para cada organismo. Aparecen recuadrados por un lado los genes candidatos a ser homólogos de la Troponina C y por otro los homólogos a la Calmodulina (una de las proteínas más conservadas en la evolución, sólo superada por las histonas). El resto de genes tienen una menor similitud con la Troponina C que la calmodulina, por lo que fueron descartados como posibles candidatos. En la figura 12B hemos construido un árbol filogenético para comprobar cómo se relacionan las traducciones de estos genes entre sí. Aparecen claramente agrupadas en una rama común todas las Troponinas C predichas.

De esta forma hemos localizado 5 genes candidatos para Troponina C en *D. melanogaster*, 6 para *A. gambiae* y sólo dos (ya anotados) para *C. elegans*. De entre los seis genes anotados para *A. gambiae* dos de ellos son una anotación doble del mismo gen (AgCG44065 y AgCG47362, ambos AgTpnCII), por lo que el número total de genes se reduce a cinco. Su relación con los cinco genes de *Drosophila* se analizará más adelante. Los dos nuevos genes localizados en *D. melanogaster* fueron renombrados DmTpnC41F (CG12408, AY283602) y DmTpnC25D (CG6509, AY283601) siguiendo la nomenclatura propuesta anteriormente (Fyrberg y otros, 1994) y basada en la localización citogenética de los genes.





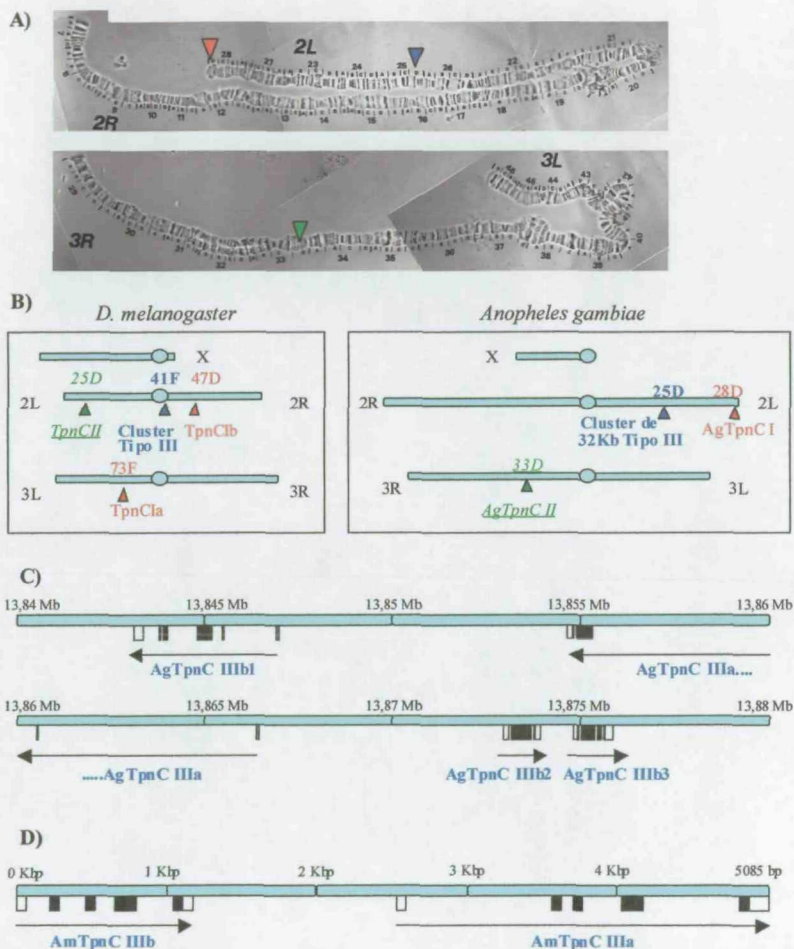
**FIGURA 12.** Localización de nuevos genes Troponina C por comparación entre especies. A) Esta gráfica muestra las 15 proteínas con mayor homología de secuencia con las Troponinas C en *Drosophila*, *Anopheles* y *Caenorhabditis*. Aparecen recuadradas en la primera fila aquellas que parecen ser verdaderas TpnC por su alta identidad y similitud de secuencia con estas, y aquellas homólogas a la Calmodulina en la segunda. B) Si construimos un árbol filogenético basándonos en estas similitudes de secuencia, las proteínas recuadradas como Troponinas C y como Calmodulinas aparecen claramente agrupadas entre sí.



Retomando la cuestión de la localización citogenética de los genes TpnC, hemos observado que están distribuidos en los diferentes cromosomas de los insectos, y las localizaciones citogenéticas no están conservadas entre *D. melanogaster* y *A. gambiae* (figura 13A). De esta forma, la nomenclatura basada en la localización citogenética no es práctica para otros insectos. Como se ha comentado en la introducción, hemos propuesto una nueva nomenclatura basada en las propiedades de cada isoforma de TpnC (Herranz y otros, 2003), extrapolable a todas las especies estudiadas, en las que la localización cromosómica de los genes no coincide con la de *D. melanogaster*.

No obstante, el dato más interesante de estas localizaciones es la posición que ocupan los genes DmTpnCIIIa y DmTpnCIIIb, justo en el límite entre la eucromatina y la heterocromatina centromérica del brazo derecho del segundo cromosoma (Herranz y otros, 2003). Se había propuesto en nuestro laboratorio que esta localización podría tener relación con la mayor variabilidad de estos genes (discutido más adelante), pero los genes homólogos a estos en *A. gambiae*, no están localizados en ninguna región heterocromatínica del genoma (figura 13B), y tienen una variabilidad similar a la encontrada en *D. melanogaster*. Sin embargo, hemos localizado una característica genómica común en los tres géneros de insecto estudiados. Los genes de tipo III aparecen siempre agrupados en una región relativamente pequeña del genoma (figura 13C). En el caso de *D. melanogaster* esta región es de 200 Kbp, pero en *Anopheles* este complejo génico contiene cuatro genes (AgCG51999 – IIIb1, AgCG52004 – IIIb2, AgCG52005 – IIIb3 y un nuevo gen candidato que no estaba anotado y está localizado entre los genes AgCG51999 y AgCG52004, al que denominamos AgTpnCIIIa) y tiene un tamaño de 32 Kbp. Inicialmente se puede considerar que los genes IIIb1 y IIIa se parecen más entre sí atendiendo a su mayor extensión y dirección en el brazo cromosómico, pero la secuencia primaria y otras características que se discutirán más adelante, corroborarán los tipos que hemos asignado a cada gen.

En los últimos meses, el genoma de *Apis mellifera*, un himenóptero, ha sido secuenciado casi en su totalidad, aunque aun no están ensambladas las secuencias. Utilizamos un abordaje similar en esta especie para localizar los genes candidatos de la Troponina C. Hemos encontrado un número similar de genes, un total de cinco, en esta especie separada de los dípteros por unos 300 millones de años de evolución. En *Apis* sólo existen dos genes de tipo III (AmTpnCIIIa y AmTpnCIIIb), pero están agrupados en una región genómica de sólo 5 Kbp (figura 12D). Su secuencia está bastante bien conservada como ocurre con los genes IIIb2 y IIIb3 de *Anopheles*.

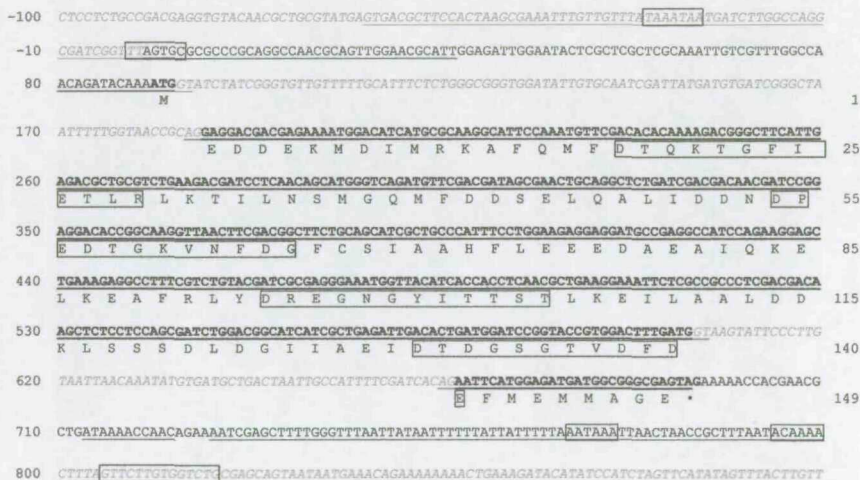


**FIGURA 13. Propiedades genómicas de los genes Troponina C.** A) Localización citogenética de los genes TpnC en los cromosomas de *Anopheles gambiae*. B) Comparación de las localizaciones en *Drosophila* y *Anopheles*. El cluster de tipo III (azul y negrita) en *Drosophila* se encuentra en una región heterocromatínica próxima al centrómero, pero esto no ocurre en *Anopheles*, en el cual el único gen en una posición próxima a la heterocromatina es el gen de tipo I (rojo), en la última banda del brazo 2L cerca de los telómeros. Los genes de tipo II se muestran en verde y con letras *itálicas* subrayadas. C y D) Organización de los genes de tipo III en *A. gambiae* y *A. mellifera*. Estos genes están organizados en tandem en una región muy pequeña del genoma de estos insectos.

### Caracterización del nuevo gen TpnCII (DmTpnC25D) en *D. melanogaster*

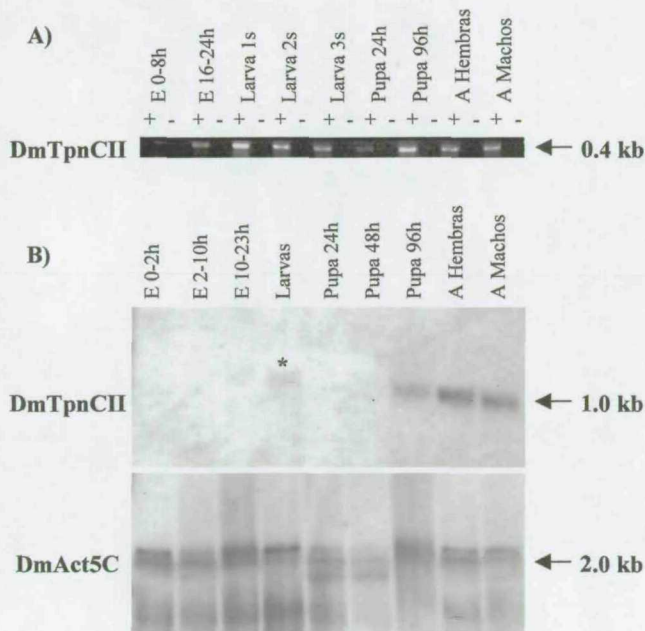
Antes de comenzar a analizar las características de los genes TpnC en su conjunto para las diversas especies utilizadas, me gustaría incluir aquí la información necesaria para equiparar el gen DmTpnCII con los otros cuatro genes TpnC cuyas características básicas fueron presentadas en la introducción.

En la figura 14 se muestra la estructura génica y la secuencia del gen DmTpnCII. Tiene una estructura más compacta que la del resto de los genes TpnC de *Drosophila* debido a que sólo presenta dos intrones de pequeño tamaño próximos al inicio y al final de la traducción. Aunque su identidad con respecto a las TpnCs clásicas (Fyrberg y otros, 1994) es menor que la identidad entre ellas mismas, los valores son parecidos a los del gen TpnCIIIb (41F), y las características de sus manos EF son compatibles con la funcionalidad de otras Troponinas C de invertebrados (se discutirá más adelante).



**FIGURA 14.** Estructura génica del gen DmTpnCII (AY283601). En negrita se muestra la secuencia codificante, en letra normal las secuencias transcritas no traducidas y en letra cursiva-sombreada las regiones intrónicas, 5' y 3' no transcritas que contienen algunas regiones conservadas con respecto a *D. pseudoobscura* posiblemente encargadas de regular la transcripción (subrayado). Aparecen recuadradas la región central (loop) de las cuatro manos EF y posibles motivos del promotor (Caja TATA y secuencia consenso del inicio de la transcripción) y de la terminación (señal de poliadenilación, secuencia de terminación CA y elemento rico en GUs (Zhao, Hyman y Moore, 1999)). La numeración en el margen derecho indica la secuencia de aminoácidos y la numeración en el margen izquierdo señala la secuencia de nucleótidos del gen empezando con el inicio de la transcripción (+1) determinado por RACE.

Su patrón de expresión a lo largo del desarrollo de *Drosophila* se muestra en la figura 15, tanto por RT-PCR como por experimentos de Northern blot. El gen *DmTpnCII* tiene un patrón de expresión más general que los demás genes *TpnC* apareciendo en todos los estadios del desarrollo y en los adultos, aunque los datos más cuantitativos de Northern blot indican que se expresa con niveles más bajos que el resto de Troponinas C, sobre todo en los estadios larvarios donde sólo se detecta residualmente (figura 15B).



**FIGURA 15.** Patrón de expresión del gen *TpnCII* durante el desarrollo de *D. melanogaster*. **A)** Experimentos de RT-PCR demuestran que este gen se expresa durante todo el desarrollo de *Drosophila*, con una bajada en los niveles de expresión durante la pupación. **B)** Un Northern blot con similares estadios del desarrollo muestra que la mayoría de la expresión se da en los adultos, aunque una traza puede aun detectarse en el estadio larvario (\*).

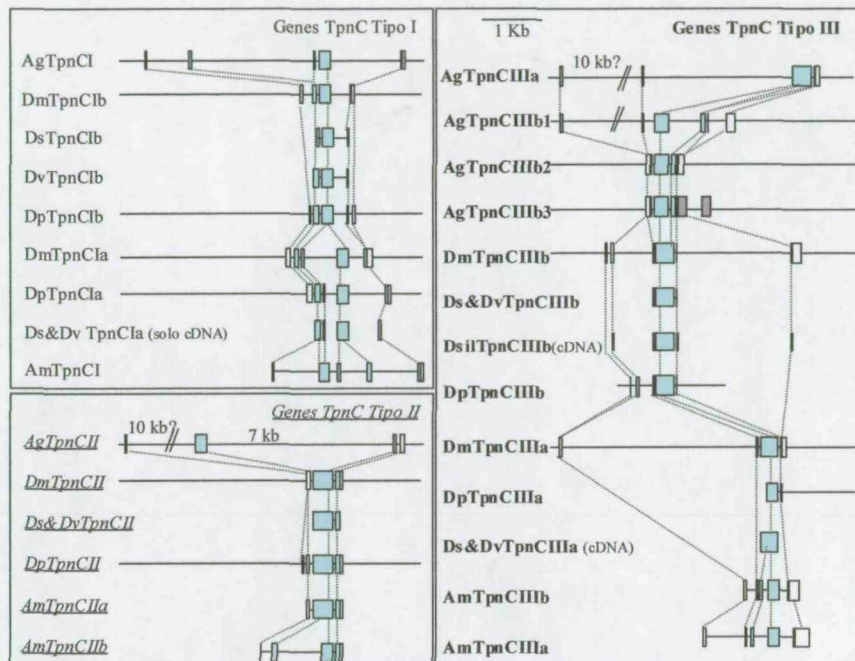


### Características de los genes TpnC. Comparaciones de secuencia.

Una vez establecido el conjunto de genes candidatos que podrían codificar para la Troponina C, vamos a emplear un abordaje evolutivo de comparación de secuencias entre especies para intentar comprender cómo y por qué se ha alcanzado este alto número de genes TpnC en insectos. Para ello hemos obtenido por PCR (ver materiales y métodos) y clonado las regiones codificantes (al menos el 80%) de los genes que codifican para la TpnC en *D. subobscura* y *D. virilis*. También hemos obtenido las regiones intrónicas (por amplificación desde DNA genómico) de un gen representativo de cada grupo (Ib, II y IIIb). Las correspondientes secuencias genómicas de los genes TpnC en *D. pseudoobscura* se han obtenido por BLAST específico utilizando los genes homólogos de *D. melanogaster* en el servidor web del Baylor College of Medicine.

Con respecto a *Anopheles*, a pesar de haber insistido en la extracción de RNA de muestras congeladas enviadas desde el MR4 Malaria Research and Reference Reagent Resource Center de tres especies de estos mosquitos, no hemos conseguido obtener ningún resultado reproducible mediante PCR. Por lo tanto sólo tenemos información de secuencia, obtenida del servidor de Emsembl Mosquito. La disponibilidad de muestras de *Apis mellifera* aún vivas y de una especie adicional silvestre nos ha permitido obtener información de secuencia y expresión en dos insectos del grupo Hymenoptera.

En la figura 16 mostramos las estructuras de todos los genes TpnC secuenciados en insectos y agrupados por el grupo funcional al que corresponden. En esta primera aproximación se puede apreciar que los genes que corresponden al mismo grupo tienen una estructura génica similar, es decir, comparten los mismos intrones. Esta conservación se pierde rápidamente en los genes de *A. mellifera*, como se describirá en próximos apartados. Para comparar las secuencias de estos genes utilizamos matrices de identidad generadas con el programa Bioedit. La obtención de conclusiones a partir de este tipo de tablas es bastante ardua, y sólo algunos datos nos aportan verdadera información. En general los genes de tipo I y II están mejor conservados (80% el DNA, 90% las proteínas) dentro del género *Drosophilidae* que los genes de tipo III (65% y 80%). La misma conclusión es extrapolable a los genes de *Anopheles*, pero los tres genes de tipo IIIb están mejor conservados de lo esperable, quizá debido a una duplicación reciente de los mismos. En el caso de *Apis* los genes de tipo III son los que mantienen una conservación mayor entre sí, pero las comparaciones con los genes ortólogos de los dípteros ofrecen un valor general del 60% a pesar de los agrupamientos, denotando la mayor distancia evolutiva que separa estas especies.

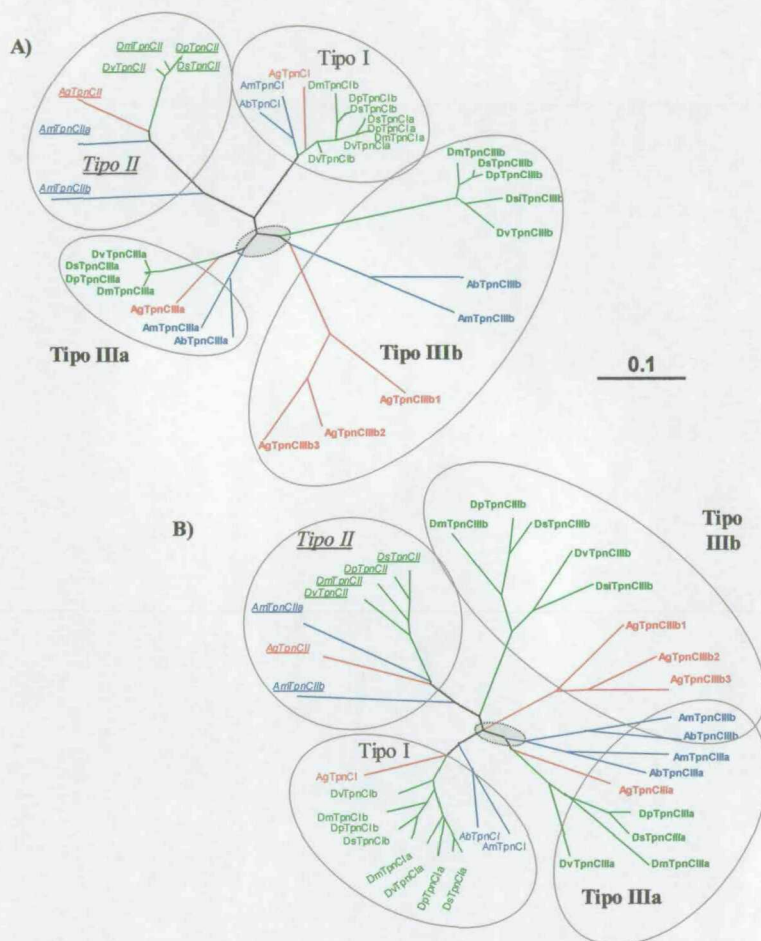


**FIGURA 16.** Estructura de los genes TpnC secuenciados en insectos. Los genes TpnC aparecen agrupados en los tres tipos descritos. Tipo I con letras regulares, Tipo II subrayado y en cursiva y Tipo III en negrita. Los exones codificantes se muestran en azul y los no codificantes en blanco. Algunos exones en gris pueden no estar correctamente anotados en las bases de datos (genbank). El DNA genómico está simbolizado por una línea continua que conecta los exones, por lo que no aparece en las secuencias de cDNA. Cuando la línea está interrumpida indicamos que es el final de la secuencia genómica conocida. Aunque los genes de *Anopheles* poseen intrones más largos que los de *Drosophila*, sus posiciones están relativamente conservadas (líneas discontinuas), elemento que rara vez se cumple cuando atendemos a los genes de *Apis*.

Utilizando el mismo programa podemos basarnos en las matrices de identidad para generar árboles filogenéticos que nos presentarán la información de una forma más asimilable (figura 17). Los árboles de la figura 17 y los siguientes se han realizado usando dos métodos alternativos y calculando los valores de bootstrap. Se puede observar como todas las Troponinas C (proteínas, figura 17A) quedan agrupadas por el tipo al que pertenecen basándonos en la similitud de sus secuencias. El grupo IIIb es el que más se ha diversificado en insectos, por lo tanto las distancias son mayores (las secuencias son menos similares). En la figura 17B podemos ver el árbol filogenético construido a partir de los datos de cDNA, es decir, influido por la degeneración codónica de la tercera base. Las ramas del árbol son en general más largas y aunque la mayoría de las asociaciones son similares a las que nos proporciona el árbol de proteínas, en este caso los genes TpnCIIIb de abejas (tanto *Apis mellifera* como la secuencia obtenida de la especie silvestre) aparecen relacionados más próximamente con sus genes parálogos (AmTpnCIIIa) que con sus genes ortólogos (Ag y DmTpnCIIIb). Esta ramificación tiene un valor de bootstrap de 48.8, indicando que aunque probablemente los genes de tipo IIIa y IIIb tienen un origen común propio en el género *Apis*, el resultado no tiene suficiente valor por sí mismo como para poder asegurarlo.

### Patrón de expresión diferencial de los genes TpnC

La nomenclatura que hemos introducido en estos genes no sólo está basada en la secuencia primaria de los genes, sino también en la posible funcionalidad de cada uno de ellos. Uno de los motivos más importantes para la generación de duplicaciones de genes y su mantenimiento es la ganancia o redistribución de las funciones que realizan, lo cual suele estar asociado a un patrón de expresión diferencial en diferentes tejidos, una propiedad denominada subfuncionalización (Force y otros, 1999, Lynch, M. y Conery, 2000, Lynch, M. y Force, 2000). Ya se había establecido que los genes de Tipo I tenían una expresión mayoritaria en los músculos larvarios y en los abdominales, mientras que los de tipo III tenían una expresión específica de adultos en *Drosophila* (Fyrberg y otros, 1994, Qiu y otros, 2003), pero estaba pendiente la localización específica de la expresión de cada isoforma en los músculos específicos del tórax, sobre todo en los músculos indirectos de vuelo por su especial mecanismo de contracción.

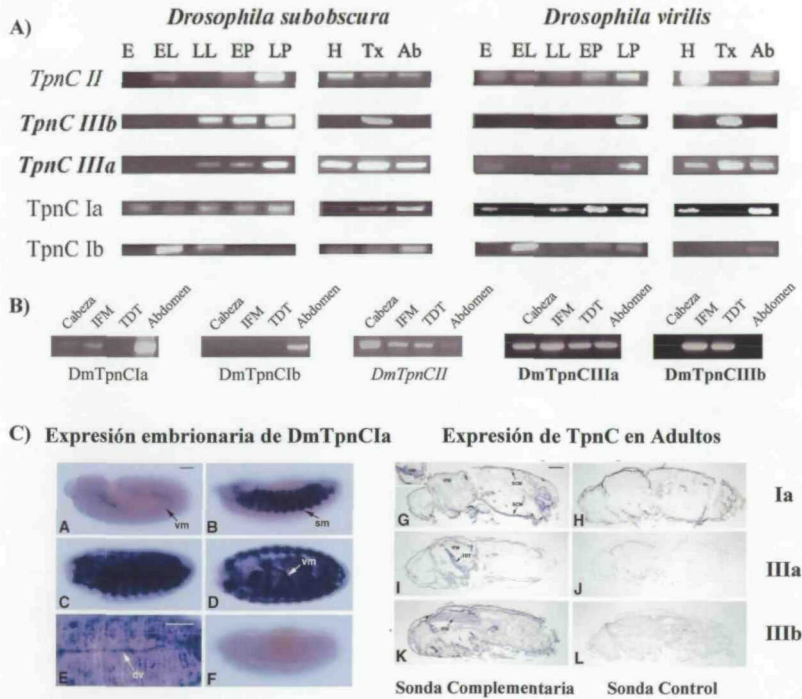


**FIGURA 17.** Diferencias entre los árboles filogenéticos creados a partir de las proteínas (arriba) o de los cDNAs (abajo) de las TpnCs de insectos. Mientras que en el árbol de proteínas las ramificaciones de los distintos grupos de TpnCs es clara, en el caso del árbol basado en secuencias de nucleótidos las ramas están a punto de colapsar (un valor bajo de bootstrap está indicado por una elipse gris), especialmente en el caso de los genes de Tipo III. Es relevante señalar que la ramificación del gen TpnCIIIb en las abejas está agrupada en el grupo IIIa en el árbol de los cDNAs, sugiriendo una diversificación relativamente temprana de estos genes. Se ha utilizado letra cursiva subrayada para los genes de Tipo II y negrita para los de Tipo III. Se utilizó en color verde para *Drosophilidae*, rojo para *Anopheles* y azul para *Apidae*. La escala indica la distancia de las ramas como número de sustituciones por nucleótido (0.1).

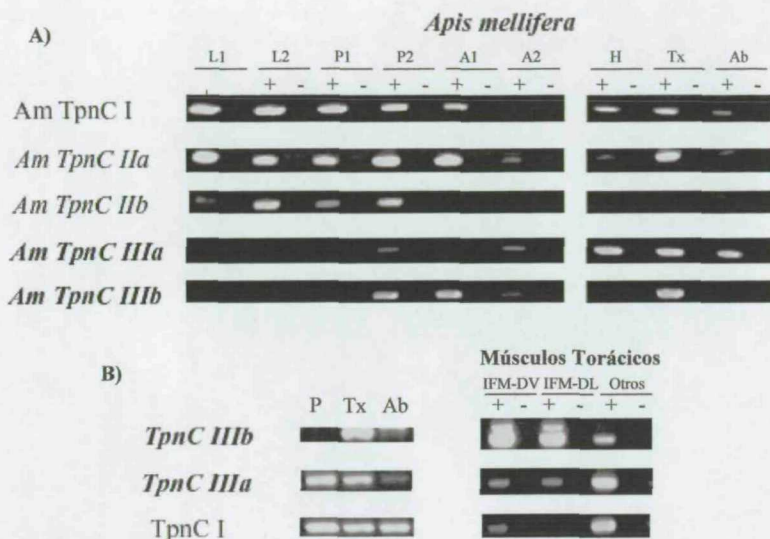


En la figura 18A mostramos el patrón de expresión detectado por RT-PCR de los cinco genes TpnC a lo largo del desarrollo y en disecciones del adulto (cabeza, tórax y abdomen) en *Drosophila subobscura* y *D. virilis*. El resultado es similar al observado en *D. melanogaster* (Herranz y otros, 2003). Los genes de Tipo I se expresan mayoritariamente en los estadios larvarios, aunque el gen TpnCIa mantiene niveles de expresión elevados en los músculos hipodérmicos del adulto (mayoritarios en el abdomen). El gen TpnCII se expresa de una manera general, con un máximo de expresión en adultos (en la fracción de las cabezas). Los genes de Tipo III se expresan exclusivamente en el sistema muscular del adulto, siendo el gen TpnCIIIa general, y el TpnCIIIb específico de la fracción torácica. Estos resultados corroboran el papel funcional de la nomenclatura de los genes, siendo los de Tipo I mayoritariamente larvarios, los de Tipo II generales y los de Tipo III específicos de adulto. En el caso de existir dos genes del mismo tipo se asigna la “a” al que tiene un patrón de expresión más general, y la “b” al que lo tiene más específico.

Para demostrar finalmente cuál es el gen TpnC específico de los músculos indirectos de vuelo en *Drosophila*, realizamos un experimento de RT-PCR con músculos aislados. En la figura 18B se puede observar que los genes de Tipo III y el de Tipo II se expresan tanto en IFMs como en los músculos del salto (TDTs), pero el gen TpnCIIIb sólo se expresa en estas fracciones. Teniendo en cuenta que estos resultados no son cuantitativos, y en colaboración con el Dr. Cripps (Univ. Of New Mexico, USA), realizamos un experimento de hibridaciones *in situ* en *D. melanogaster* para poder determinar mejor los niveles de expresión de las TpnCs en cada tejido (figura 18C). En el estadio embrionario sólo se localizó expresión del gen TpnCIa, por lo que pensamos que el gen TpnCIb debe expresarse con niveles menores o en un momento muy concreto del desarrollo larvario (tampoco se detecta expresión embrionaria del gen TpnCIb por RT-PCR, figura 18A). En los adultos sólo se detectaron altos niveles de expresión para los genes TpnCIb (músculos hipodérmicos) y los genes de Tipo III, en los que se pudo apreciar que el gen TpnCIIIb tiene altos niveles de expresión en los IFMs mientras que el gen TpnCIIIa se expresa mayoritariamente en los TDTs.



**FIGURA 18. Patrón de expresión de los genes TpnC en *Drosophilidae*.** **A)** Se realizaron experimentos de RT-PCR con dos especies de *Drosophila* para determinar la conservación de la expresión de estos genes. Se aisló RNA de embriones (E), larvas tempranas y tardías (EL, LL), pupas tempranas y tardías (EP, LP) y tres fracciones del adulto (Cabeza-H, Tórax-T y Abdomen-A). Los genes de Tipo I son mayoritariamente larvarios (Ib) y abdominales (Ia), los de Tipo II tienen una expresión alta en cabezas y los de tipo III comienzan a expresarse en el estado de pupa y alcanzan máximos niveles en los tóraces, siendo el gen IIIb totalmente específico de esta fracción. **B)** Experimentos de RT-PCR para detectar la expresión en músculos aislados del tórax (Cabeza, IFM, TDT y Abdomen) de *D. melanogaster*. No se detectaron bandas en ausencia de retrotranscriptasa (resultados no mostrados). Ambas isoformas de tipo III se expresaron en IFMs y TDTs aunque IIIb lo hizo específicamente. *DmTpnCII* también se expresa en los músculos torácicos, incluso es posible detectar algo de expresión de la isoforma Ia en IFMs, aunque es básicamente abdominal. **C)** Hibridación *in situ* con sondas de los genes TpnC. El único gen detectado en los estadios embrionarios fue *DmTpnCIa*, que comienza a expresarse en los precursores de los músculos viscerales en estadio embrionario 12. En sucesivos estadios comienza a expresarse en todos los tipos musculares del embrión. A la derecha se muestran los patrones de expresión de los genes detectados en adultos. El gen *TpnCIa* se expresa en los músculos abdominales y en la cabeza, el gen *IIIa* es específico de TDTs y el *IIIb* específico de IFMs, indicando una vez más la no cuantitatividad de las RT-PCRs.



**FIGURA 19. Patrón de expresión de los genes TpnC en *Apidae*. A)** Patrón de expresión durante el desarrollo de los genes TpnC en *A. mellifera*. Se utilizaron las fracciones L1 y L2 (larvas sin recubrir y larvas cubiertas en el panel), P1 y P2 (pupas sin pigmentación y pupas con los ojos totalmente pigmentados y la morfología del adulto formada) y A1 y A2 (adultos recién emergidos y adultos maduros con al menos 15 días). Adicionalmente se diseccionó cabeza (H), tórax (T) y abdomen (A). Se han incluido los controles negativos (sin retrotranscriptasa) en la figura (-). Los genes I y II se expresan durante el desarrollo de la abeja con altos niveles de expresión, aunque el gen IIb tiene un patrón de expresión más restringido, recordando al gen DmTpnC1b. Los genes de tipo III se expresan del mismo modo que sus genes homólogos en *Drosophila*. **B)** Patrón de expresión en disecciones de adulto de la especie *Apidae* silvestre. Tanto en las fracciones de patas, tórax y abdomen, como en las disecciones de IFM-dorsoventrales, IFM-dorsolongitudinales y otros (TDTs, músculos viscerales e hipodérmicos del tórax), se detecta un patrón de expresión IFM específico para el gen IIIb, un patrón de expresión característico de TDTs (tórax y patas) para el gen IIIa y un patrón más general para el gen I, ausente en IFMs y responsable de los músculos hipodérmicos y viscerales del adulto.

Experimentos similares se realizaron con estadios del desarrollo de *Apis mellifera* y con disecciones del adulto de una especie silvestre relacionada (figura 19). El gen AmTpnCI se expresa de una manera similar a su ortólogo DmTpnCIa y lo mismo ocurre con los genes AmTpnCIIIa y IIIb, siendo específicos de adulto, y el segundo específico de IFMs. Una segunda banda de mayor peso molecular al esperado para el gen TpnCIIIb en la especie silvestre de *Apis* aparece en los IFMs. No hemos podido identificar hasta el momento qué secuencia está codificando. Los genes de Tipo II en *Apis* tienen un patrón de expresión más difícil de relacionar con los genes de *Drosophila*. El patrón de expresión de AmTpnCIIa es similar al de su ortólogo en *Drosophila*, pero no se ha detectado un nivel de expresión elevado en ninguna parte del adulto. El gen AmTpnCIIb parece estar supliendo la función de segundo gen embrionario dado que en esta especie sólo existe un gen de Tipo I. Ambos genes de Tipo II no se han detectado en la segunda especie de *Apis*, debido en parte a su nivel de expresión mínimo en adultos y a la baja conservación de la secuencia entre estas dos especies (los oligonucleótidos diseñados para *Apis mellifera* no tienen porque anillar correctamente en los genes de la otra especie). Las diferencias en las secuencias de estas dos especies sugieren una distancia evolutiva entre ellas de al menos 60 millones de años (distancia *D. melanogaster* / *D. virilis*). Por lo tanto la nomenclatura utilizada para nombrar a los genes TpnC de *Apis* basada en la homología de secuencia de estos genes con los de *Drosophila* (ver sección anterior) no se ajusta tan bien a los patrones de expresión como ocurre con *Drosophila*, denotando una diferente utilización de las isoformas disponibles.

### **Características de los genes TpnC. Las manos EF**

La secuencia proteica de las Troponinas C es una sucesión de cuatro motivos mano EF, encargadas de ligar cationes divalentes. La familia de proteínas con manos EF ha sido extensivamente estudiada y clasificada en mamíferos (Nakayama y Kretsinger, 1994, Kawasaki, Nakayama y Kretsinger, 1998), pero han aparecido también algunos trabajos sobre la funcionalidad de estos dominios en TpnCs de invertebrados (Allhouse y otros, 1999, Ojima y otros, 2000, Ueda y otros, 2001, Qiu y otros, 2003). Basándonos en la conservación de la secuencia canónica de las secuencias de unión de calcio en las manos EF en la librería del CaBP (Marsden, Shaw y Sykes, 1990) y en la conservación de estas secuencias con respecto a las de manos EF con funcionalidad ya descrita,



hemos estudiado la distribución de manos EF funcionales en las Troponinas C de insectos (figura 20).

En los mamíferos, el dominio carboxilo terminal (tercera y cuarta manos EF, con alta afinidad por cationes calcio o magnesio, permanentemente unidos a ellas) está muy conservado en secuencia, debido en parte a la función estructural de este dominio frente a la función reguladora del dominio amino terminal. En invertebrados esta conservación sigue siendo observable, aunque la funcionalidad de las manos EF no es similar, siendo reguladoras todas las manos EF funcionales (baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ ).

La cuarta mano EF (en la zona carboxilo terminal de la Troponina C) es funcional en todas las especies de invertebrados en los que se ha ensayado su actividad. Su secuencia proteica se ajusta perfectamente a la secuencia canónica en todas las TpnC de insectos, con pequeñas variaciones asociadas a los diferentes tipos (I, II o III) pero siempre conservativas (un aminoácido es sustituido por otro con las mismas características físico-químicas).

La tercera mano EF en cambio presenta una mayor variabilidad. Esta mano EF no puede ligar calcio en ninguna TpnC de invertebrados, y de hecho algunos de sus aminoácidos ácidos claves para la unión de cationes divalentes se han perdido, hecho especialmente observable en las Troponinas de tipo I de *Drosophila*. Sin embargo se ha publicado que la TpnC del artrópodo *Balanus nubilus*, es capaz de unir cationes magnesio con una región localizada en el dominio carboxilo terminal de la TpnC que no es la cuarta mano EF (capaz de unir calcio con baja afinidad), y durante la purificación de la TpnC en laboratorio se utiliza AEDT como quelante de magnesio para facilitar la disociación de la Troponina C y la Troponina I (resultados sin publicar). A pesar de ser más variable que la cuarta mano EF, la secuencia de esta tercera mano EF está muy bien conservada en la mayoría de las TpnCs de insectos, por lo que sugerimos que podría unir magnesio en este dominio modificando de este modo las interacciones con la Troponina I. El caso de las TpnCIIIb de *Anopheles* es especialmente interesante, dado que esta mano EF acumula pequeñas variaciones en estas isoformas, al parecer modificando la capacidad de unión de magnesio con mayor o menor afinidad.

La segunda mano EF de las TpnCs tiene una funcionalidad variable en invertebrados. Normalmente cuando existen dos isoformas de TpnC en el mismo organismo una de ellas une calcio con este dominio y la otra no (Allhouse y otros, 1999, Ueda y otros, 2001). En el hemíptero *Lethocerus indicus* se ha descrito que la TpnC

Consenso Mamíferos	D	*	D	G	D/S	G	#	I	D/G/S	*	D/E	E
Sec. lazo: 12aa	98%	--	73%	51%	56/22	89%	--	70%	33/14/19	--	27/32	86%

**Lazo 1<sup>era</sup> Mano-EF**

DmTpnCIa	DHQTGSISPTM
DsTpnCIa	****S*****
DmTpnCIb	*****Y***S*
AgTpnCI	*RE*****SSD*
AmTpnCI	*RE*S*****D*
LiTnCI	*RERS*****D*
DmTpnCIIa	*PE*N*Y*N*A*
AgTpnCIIb1	*KE*****DV
AgTpnCIIa	*QE*K*C*G*Q*
AgTpnCIIb2	*IE*K***SV*V
AgTpnCIIb3	*IE*K***SL*V
AmTpnCIIa	****K***G*D*
LiTnCI	AQE*S*Y*EAN*
AmTpnCIIb	*PD*K*T*T*DT
LiTnCI	TPEG*S*RVS*DQ
DmTpnCIIb	*DGA**EHAD
DsTpnCIIb	*DGA***DHTD
DsTpnCIIb	*LDGS***DHS
DvTpnCIIb	*LEG*W*DHKD
DmTpnCII	*T****F*E*LR
DvTpnCII	*T****F*E*LR
AgTpnCII	*T****F*E*IK
AmTpnCIIa	*TT*S*F*D*LK
AmTpnCIIb	*ST*S*R*EK*K

**Lazo 2<sup>da</sup> Mano-EF**

DmTpnCIa	DEDKSGRLFEFE
DmTpnCIb	*****E*
DvTpnCIb	*****SKC*****E*
AgTpnCI	*****QI**A*
AmTpnCI	*A*****E*
LiTnCI	*A*****E*
DmTpnCIIa	***G**QI**E*
AgTpnCIIb1	***E**Q**E*
AgTpnCIIa	*A*G*E**E*
AgTpnCIIb2	*V*E*QI**D*
AgTpnCIIb3	***E*QI**E*
AmTpnCIIa	***G*Q**E*
LiTnCI	*A*G*Q**E*
AmTpnCIIb	*PFG*EMN*E*
LiTnCI	*PFGN*DI*DS
DmTpnCIIb	*KGTT*K*D*SQ
DsTpnCIIb	*KGTS*K*D*GQ
DsTpnCIIb	*KGTSNK*N*AQ
DvTpnCIIb	*KGTEK*N*SQ
DmTpnCII	*PEDT*KVN*DG
AgTpnCII	*PEST*VN*DG
AmTpnCIIa	*PEGT*KVN*DG
AmTpnCIIb	*EEG*K*N*DS

**Lazo 3<sup>era</sup> Mano-EF**

DmTpnCIa	DKQNGFIPTTC
DmTpnCIb	*****Y***S*
AgTpnCI	*E*****
AmTpnCI	*E*****
LiTnCI	*E*****
DmTpnCIIa	*E*****
AgTpnCIIb1	*DAK*VL*VEE
AgTpnCIIa	*E*****
AgTpnCIIb2	*N*T***LDV
AgTpnCIIb3	*D*T***VNS
AmTpnCIIa	*E*****
LiTnCI	*D*****
AmTpnCIIb	*E*****
LiTnCI	*E*****
DmTpnCIIb	*E*****
DmTpnCIIb	*E*****
DmTpnCII	*RE*****
AgTpnCII	*RE*****
AmTpnCIIa	*RE*****
AmTpnCIIb	*RE*****

**Lazo 4<sup>ta</sup> Mano-EF**

DmTpnCIa	DSGSGTVDFDE
DmTpnCIb	*****
AgTpnCI	*****
AmTpnCI	*****
LiTnCI	*T*****
DmTpnCIIa	*****
AgTpnCIIb1	*A*****E*
AgTpnCIIa	*****
AgTpnCIIb2	*A*****E*
AgTpnCIIb3	*A*****E*
AmTpnCIIa	*A*****L*
LiTnCI	*S*****
AmTpnCIIb	*A*****E*
LiTnCI	*A*****E*
DmTpnCIIb	*A*****E*
DmTpnCII	*T*****
AgTpnCII	*T*****
AmTpnCIIa	*T*****
AmTpnCIIb	*T*****

**FIGURA 20.** Comparación de los motivos centrales de las Manos EF en las TpnC de insectos. Se muestran sombreadas en gris las posibles manos EF funcionales con baja afinidad por Ca<sup>2+</sup> (reguladoras) y en gris oscuro con letras blancas los sitios potenciales de unión de Mg<sup>2+</sup>. Las manos EF no funcionales no aparecen sombreadas. Aunque no son secuencias idénticas, las manos EF de *D. melanogaster* (D.m) están altamente conservadas en *D. subobscura* (D.s.) y *D. virilis* (D.v.). También se muestran las manos EF del gen IIb en *D. silvestris* (D.si). Sólo se muestran las manos EF que han variado con respecto a *D. melanogaster*, y las de *D. pseudoobscura* son idénticas a las de *D. subobscura*. Las secuencias incluidas en cajas separan los tres grupos de TpnCs (Tipo I, caja superior, Tipo II caja inferior y Tipo III entre ellas). Cuando los aminoácidos están conservados se representa con un punto, usando DmTpnCIa como referencia.

específica de IFMs (LiTpnC1, correspondiente al tipo IIIa) une calcio en las manos EF II y la IV. Sin embargo la isoforma LiTpnC4 (correspondiente al tipo IIIb, expresada también en patas) sólo mantiene funcional la cuarta mano EF (Qiu y otros, 2003). En nuestro caso observamos que la segunda mano EF de las Troponinas C de tipo I y IIIa en los insectos estudiados es teóricamente capaz de unir calcio, sin embargo las de tipo II y IIIb han perdido aminoácidos clave para esta función, excepto en el caso de las tres Troponinas C IIIb de *Anopheles*, que parecen haber retenido esa capacidad, diferenciándose en la capacidad de unión de magnesio de la tercera mano EF.

La primera mano EF es sin lugar a dudas la menos conservada de las TpnCs de insectos. Solamente las TpnCIIIb de Drosophilidae (que no tienen la segunda mano EF funcional) han mantenido los cuatro residuos ácidos (en posición 1,3,9 y 12) y las dos glicinas (4 y 6) imprescindibles para la unión de calcio. Sin embargo la secuencia proteica está relativamente conservada dentro de cada grupo, por lo que esta región debe tener alguna función, a pesar de no unir calcio en la mayoría de las isoformas.

### **Características de los genes TpnC. Orientación espacial de las manos EF**

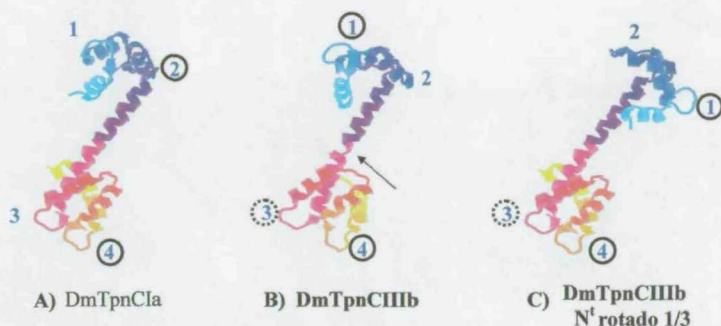
Aún es posible extraer un dato adicional de la secuencia proteica de las Troponinas C en insectos. Cuando se realiza un alineamiento de las Troponinas C de los distintos grupos y especies la posición de las manos EF está claramente conservada, pero en la región de alfa-hélice central suelen aparecer inserciones o deleciones de aminoácidos. En la Tabla 5 aparece resumida la teórica funcionalidad de cada mano EF y las indels (inserciones o deleciones) en la alfa-hélice central. En el caso de las Troponinas C de Tipo IIIb hay un ácido glutámico adicional en la alfa hélice. Utilizando como molde la estructura tridimensional de varias Troponinas C cristalizadas en vertebrados podemos inferir la posible estructura de estas proteínas (figura 21A). La inserción de un glutámico adicional en el centro de la alfa-hélice central provoca, en la simulación, una ruptura en la estructura de alfa-hélice (figura 21B), lo cual podría proporcionar una diferente flexibilidad de este dominio central de la proteína, encargado de desplazar un dominio globular con respecto al otro en presencia de calcio. Otra alternativa posible sería que la adición de un aminoácido desplazara un tercio de vuelta la alfa-hélice, provocando una diferente distribución espacial de las manos EF con respecto al resto del complejo troponina, de manera que la primera mano EF (funcional en las isoformas IIIb de drosophilidae) ocupara la posición relativa de la segunda mano EF (figura 21C).

En cualquier caso la combinación del patrón de expresión, propiedades de las manos EF y posibles indels en las Troponinas C hace que cada una de ellas tenga unas características únicas para dar respuesta a las necesidades específicas de cada tejido muscular, expresándose por separado, o incluso en conjunto con diferentes niveles de expresión como se ha descrito para la TpnT de libélula (Marden y otros, 1999, Marden y otros, 2001).

Proteína	Tipo	Mano EF I	Mano EF II	Indels $\alpha$ -hélice	Mano EF III	Mano EF IV
DmTpnCIa	I	-	+	-	-	+
DmTpnCIb	I	-	+	-	-	+
AgTpnCI	I	-	+	-	*	+
AmTpnCI	I	-	+	-	*	+
LiTpnC3	I	-	+	-	*	+
DmTpnCII	II	-	-	-	*	+
AgTpnCII	II	-	-	+Q	*	+
AmTpnCIIa	II	-	-	-	*	+
AmTpnCIIb	II	-	-	+Q-LD	*	+
DmTpnCIIIa	III	-	+	-	*	+
AgTpnCIIIa	III	-	+	-	*	+
AmTpnCIIIa	III	-	+	-	*	+
LiTpnC1	III	-	+	+DNE	*	+
DmTpnCIIIb	III	+	-	+E	*	+
AgTpnCIIIb1	III	-	+	+E	*	+
AgTpnCIIIb2	III	-	+	+E	-	+
AgTpnCIIIb3	III	-	+	+E	*	+
AmTpnCIIIb	III	-	-	+E	*	+
LiTpnC4	III	-	-	+G	*	+

**TABLA 5. Propiedades funcionales conservadas entre diferentes TpnCs de insectos.** Unión de calcio (+) a las manos EF o no (-), unión de magnesio (\*) e inserciones/delecciones de aminoácidos en la  $\alpha$ -hélice central. Además de los resultados generados por nosotros en *Drosophila*, *Apis* y *Anopheles*, hemos introducido los datos publicados de *Lethocerus* (Qiu y otros, 2003).





**FIGURA 21. Predicción de estructura tridimensional para la TpnC de *Drosophila*.** A) Estructura predicha para la isoforma DmTpnCIa usando como moldes estructuras de la TpnC de mamíferos (*Oryctolagus cuniculus*). B) Estructura predicha para la isoforma DmTpnCIIB. Se observa una ruptura en la alfa-hélice central debida a la inserción de un ácido glutámico. C) Reconstrucción del modelo para DmTpnCIIB rotando 1/3 el dominio globular amino terminal con respecto al carboxilo terminal. Los lazos de las manos EF ocuparían una posición espacial diferente con respecto al otro dominio de la TpnC. Las manos EF teóricamente funcionales aparecen dentro de un círculo (discontinuo para el  $Mg^{2+}$ ).

### Características de los genes TpnC. Posición relativa de los intrones

Como se introdujo en la figura 16 (Estructura de los genes TpnC), la posición relativa de los intrones en los genes troponina C con respecto a las manos EF es un dato de especial interés para estudiar la evolución de esta familia multigénica. La inserción o deleción de intrones es un “evento genómico inusual”, es decir, es un proceso raro en la línea evolutiva de un gen, por lo que se puede utilizar para seguir la evolución de los mismos (Rokas y Holland, 2000, Venkatesh, Erdmann y Brenner, 2001). Yuasa y Takagi (Yuasa, Cox y Takagi, 1998, Yuasa y Takagi, 2000, 2001) ya introdujeron este tipo de abordaje para estudiar la evolución de los genes TpnC y las calmodulinas en precordados, llegando a la conclusión de que la posición de los intrones está muy bien conservada en estos genes con la excepción del intrón que aparece en la tercera mano EF, variable en la línea evolutiva de los vertebrados. Aunque intentaron extrapolar los resultados a los invertebrados, en el caso de *Drosophila* sólo tuvieron en cuenta el gen DmTpnCIa, lo cual impidió que observaran la variabilidad de la posición de los intrones en las TpnCs de invertebrados, pues este gen es el que mejor ha conservado los intrones con respecto a los genes TpnC de vertebrados.

Nosotros hemos aplicado este abordaje a todos los genes TpnC descritos en esta memoria, y los resultados están tabulados en la tabla 6. Los intrones se nombran utilizando el criterio propuesto por Nakayama y Kretsinger (Nakayama y Kretsinger, 1993), a saber, el primer número corresponde a la mano EF que interrumpe el intrón, seguido de un punto aparece el número del aminoácido interrumpido en la mano EF, y seguido tras una barra la fase de lectura en la que entra el intrón (0, entre codones, +1 el intrón comienza tras la primera base del codón y +2 el intrón comienza tras la segunda base del codón). Entre paréntesis se incluye la longitud del intrón en pares de bases.

Especie	Gen TpnC	Posición relativa de los intrones en la región codificante (Kretsinger & Nakayama, 1993)						Feno-tipo	Geno-tipo
Mamíferos	<i>Fibra rápida</i>	-17/0	1.01/1	2.13/1	3.11/2	4.21/1	---		
	<i>F. lenta/card.</i>	-10/0	1.01/1	2.13/1	3.11/2	4.21/1	---		
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Fibra rápida</i>	-18/0	NA	NA	3.11/2	NA	---		
	<i>F. lenta/card.</i>	NA	NA	NA	3.11/2	NA	---		
<i>Fugu rubripes</i>	<i>Fibra rápida</i>	-10/0	1.01/1	2.13/1	3.11/2	4.21/1	---		
	<i>F. lenta/card.</i>	-10/0	1.01/1	2.13/1	3.11/2	4.21/1	---		
<i>Amphioxus</i>		-17/0	1.01/1	2.13/1	3.24/0	4.21/1	---		
Ascidios		-10/0	1.01/1	2.13/1	3.24/0	4.21/1	---		
<i>A. scallop</i> (Molusco)		-12/0	1.01/1	2.13/1	---	4.21/1	---		
Anélidos		-13/0	1.01/1	2.13/1	3.23/2	4.21/1	---		
Nemátodos	<i>TpnC I(pat-10)</i>	-17/0 (68)	1.01/1 (50)	2.01/0 (407)	3.13/0 (50)	---	---	III?	III?
<i>(C. elegans)</i>	<i>TpnC 2</i>	-17/0 (77?)	1.22/0 (102)	2.13/1 (49)	3.13/0 (460)	---	---	I?	I?
<i>Apis mellifera</i>	<i>AmTpnCI</i>	NA	1.01/1 (913)	2.13/1 (158)	3.13/1 (711)	4.21/1 (1137)	---	I	I
	<i>AmTpnCIIa</i>	-7/0 (130)	---	---	---	4.21/1 (62)	---	II	II
	<i>AmTpnCIIb</i>	-7/0 (404)	1.01/1 (459)	2.10/1 (1220)	---	4.21/1 (386)	---	II	III
	<i>AmTpnCIIIa</i>	-8/0 (161)	1.01/1 (133)	2.13/1 (89)	---	4.21/1 (301)	---	III	I
	<i>AmTpnCIIIb</i>	-10/0 (898)	1.01/1 (69)	2.13/1 (191)	---	4.21/1 (369)	---	III	I
<i>Anopheles gambiae</i>	<i>AgTpnCI</i>	-9/0 (762)	1.01/1 (1941?)	2.13/1 (90)	---	4.21/1 (1357)	---	I	I
	<i>AgTpnCII</i>	-8/0 (10kb?)	---	---	3.20/2 (3.1kb)	4.21/1 (111)	---	II	II
	<i>AgTpnCIIIa</i>	-10/0 (3kb?)	1.01/1 (5,6kb)	---	---	4.21/1 (73)	NA	III	III
	<i>AgTpnCIIIb1</i>	-8/0 (kb?)	1.01/1 (292)	---	3.13/1 (746)	4.21/1 (107)	4.28/1 (457)	III	III
	<i>AgTpnCIIIb2</i>	---	1.01/1 (66)	---	3.13/1 (68)	4.21/1 (75)	---	III	III
	<i>AgTpnCIIIb3</i>	---	1.01/1 (83)	---	3.13/1 (73)	4.21/1 (91)	NA	III	III
<i>Drosophilidae</i>	<i>TpnCIa</i>	-10/0 (72/79)	1.30/0 (64/78)	2.13/1 (770/214)	---	4.21/1 (363/484)	---	I	I
	<i>TpnCIb</i>	-10/0 (156/67)	---	2.13/1 (58/56)	---	4.21/1 (437/272)	---/4.28/1 (76)	I	I
(Dmel/Dpse)				(64/66)		(246/245)			
(Dsub/Dvir)	<i>TpnCII</i>	-5/0 (93/73)	---	---	---	4.21/1 (62/76)	---	II	II
						(74/80)			
	<i>TpnCIIIa</i>	-9/0 (2977?)	1.01/1 (53??)	---	---	4.21/1 (64/63)	---	III	III
	<i>TpnCIIIb</i>	-11/0 (889/237)	1.01/1 (49/57)	---	---	4.21/1 (54/72)	4.28/1	III	III
			(55/61)			(64/75)	(2589/-1kb)		

**TABLA 6.** Posición relativa de los intrones con respecto a las manos EF en las TpnCs de diversas especies. Los intrones están definidos por varios números siguiendo la anotación de Nakayama y Kretsinger (1993). El primer número indica la mano EF que interrumpe el intrón, numeradas estas de 1 a 4 desde el dominio N al C terminal. El segundo número, después de un punto, indica el residuo en esa mano EF, y el tercer número tras una barra, indica la fase de lectura que interrumpe el intrón (0, entre codones, 1 entre el primer y segundo nucleótido de un codón y 2 entre el segundo y tercer nucleótido de un codón). Entre paréntesis se indica la longitud del intrón en bp. (---) indica la ausencia de intrón en esa posición y NA, información no disponible. La tabla está basada en los datos de Yuasa y Takagi (2000,2001) actualizados con nuestra información en *C. elegans*, *Fugu*, *Apis*, *Anopheles* y *Drosophilidae*. La información en las cuatro *Drosophilidae* aparece combinada dado que la mayoría de los intrones están conservados en posición, pero no en longitud, indicándose en la primera línea los datos de *D. melanogaster* y *D. pseudoobscura* y en la segunda los de *D. subobscura* y *D. virilis* (datos omitidos cuando no están disponibles). Como en otras figuras se indican los genes de tipo II en cursiva y los de tipo III en negrita. Estos datos invalidan la teoría previa sobre la alta conservación de la posición de los intrones en protostomos.

Con excepción del intrón 4.21/1, que está presente en todos los genes TpnC de insectos, todos los demás son variables dependiendo del gen que observemos. El primer intrón, localizado uno o dos aminoácidos después del inicio de la traducción, es muy variable en longitud, pero aparece en casi todos los genes. El último intrón, 4.28/1 está localizado unos aminoácidos antes del codón de terminación, por ello y al igual que el primer intrón, tiene más flexibilidad que los demás intrones para aparecer o desaparecer, pues sólo se requiere un codón de parada a poca distancia para producir una Troponina C funcional. Esto provoca que estos intrones no sean relevantes para seguir la historia evolutiva de estos genes, pues son variables hasta el punto de que el intrón 4.28/1 aparece en el gen TpnCIb de *D. pseudoobscura* y no en el mismo gen de *D. melanogaster*.

El intrón de la tercera mano EF en mamíferos, 3.11/2 no aparece en ninguno de los genes TpnC de insectos, estando de acuerdo con Yuasa y Takagi (2000,2001) en que el precursor de los genes TpnCs de todos los metazoos no poseía este intrón. En algunos genes de insectos aparecen intrones en esta mano EF, pero en otras posiciones (3.13/1 o 3.20/2) y pensamos que se han obtenido más recientemente.

El intrón 1.01/1 y el 2.13/1 son los más relevantes para este estudio, pues podemos datar cómo se han perdido durante la generación de los diferentes tipos de TpnCs en insectos. El intrón 1.01/1 se ha mantenido en todos los genes de tipo III, aunque también aparece en los genes de tipo I de *Anopheles* y en el I y IIb de *Apis*. El intrón 2.13/1 aparece en todos los genes de tipo I, pero adicionalmente aparece en los genes de tipo III de *Apis*. Como se discutirá más adelante todos los genes que contienen el intrón 2.13/1 han evolucionado desde un precursor común, al igual que aquellos que sólo tienen el intrón 1.01/1 o los que tienen ambos intrones.

Hemos intentado analizar las secuencias intrónicas en busca de elementos conservados que nos permitieran seguir la evolución de estos genes. Por desgracia los únicos elementos conservados localizados son aquellos necesarios para el procesamiento de los intrones, lo cual no nos ha suministrado ninguna información. Estudios de este tipo se han realizado con éxito cuando se disponía de las secuencias intrónicas de un gen en varias especies muy próximas en la evolución (hasta un máximo de diez millones de años, (Clark, Leicht y Muse, 1996)).



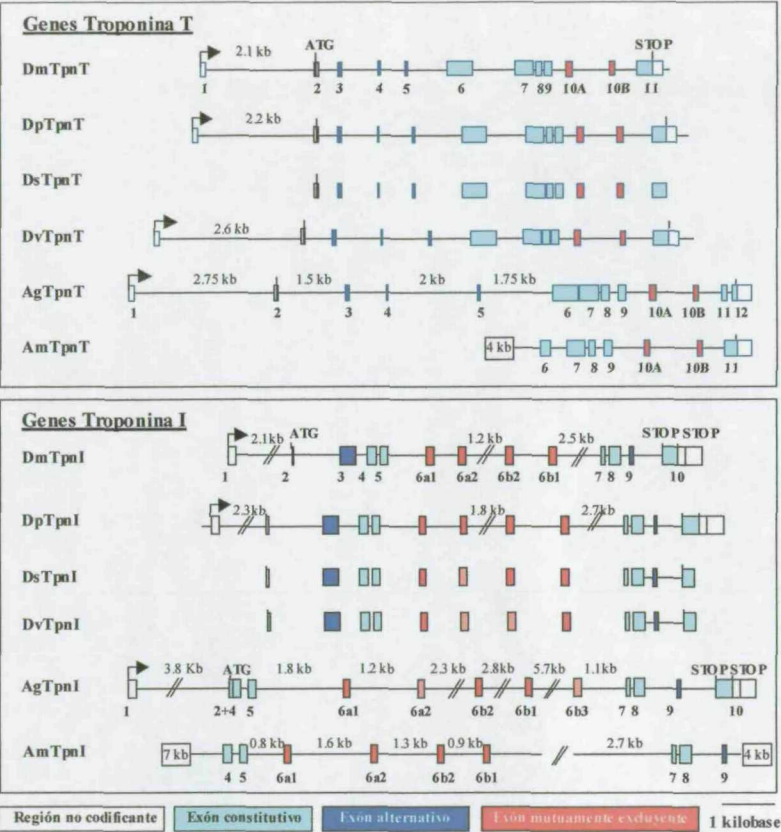
### Estructura de los genes TpnT y TpnI en insectos

Una vez analizados los genes Troponina C de varias especies de *Drosophila*, *Anopheles* y *Apis*, nos propusimos hacer un esfuerzo similar con los otros dos genes que codifican los miembros del complejo Troponina. Los genes TpnT y TpnI en *Drosophila* son genes únicos y obtienen su repertorio de isoformas por procesamiento alternativo (Barbas y otros, 1993, Benoist y otros, 1998). En la figura 22 se presentan las estructuras génicas de la TpnT y la TpnI en los dípteros analizados y las secuencias correspondientes a *Apis mellifera* que hemos podido ensamblar a partir de alineamientos de los fragmentos disponibles del genoma de este insecto, con un tamaño medio de 800 bp. Aunque las regiones 5' de ambos genes no han sido localizadas en esta especie, la mayor parte de la región codificante esta disponible.

La estructura génica está muy bien conservada en todas las especies siendo la principal diferencia entre ellas el tamaño de los genes, creciente desde *D. melanogaster* hasta *A. gambiae*, de una manera relativa al tamaño del genoma de cada organismo (de 178kB en *D. melanogaster* (Adams y otros, 2000) a 278 Kb en *A. gambiae* (Holt y otros, 2002)) y debido a la variación en el tamaño de los intrones. La localización cromosómica de estos genes no está conservada al igual que ocurría con los genes TpnC. Ambos genes aparecen en el cromosoma X de *D. melanogaster*, mientras que el gen AgTpnT aparece en el brazo derecho del cromosoma 2 de *Anopheles* y el gen AgTpnI ha sido localizado en un fragmento desconocido del genoma.

El gen Troponina T tiene exactamente la misma composición exónica en todas las especies analizadas y la secuencia de estos exones está muy bien conservada. La secuenciación de los mensajeros de TpnT en *D. subobscura* nos proporcionó una región altamente variable localizada exactamente en el exón 10. Un análisis de las secuencias genómicas de *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura* y *D. virilis* (clonada en nuestro laboratorio (Benoist y otros, 1998)), nos hizo observar que esta nueva secuencia aparecía conservada en todas las especies y correspondía a un nuevo exón 10 (10A por su posición en el gen) mutuamente excluyente con el exón 10 (10B) previamente descrito, ambos con la misma longitud, 79 nucleótidos que codifican para 26 aminoácidos. Esto incrementa las regiones de variabilidad por procesamiento alternativo en este gen a dos, una de ellas localizada en la región amino terminal de la proteína y otra en la región carboxilo terminal justo antes de que comience la secuencia terminal rica en ácido glutámico. La principal diferencia entre estos genes está en la longitud de la cola de poliglutamícos, que está dividida en dos exones en el gen TpnT de *Anopheles*.





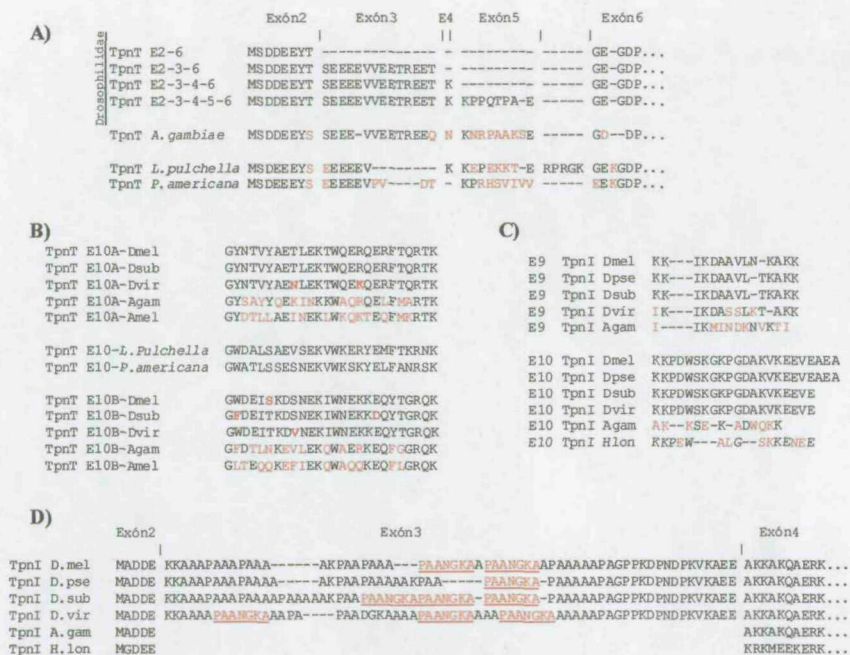
**FIGURA 22. Estructuras génicas de la Troponina T y la Troponina I en insectos.** Los exones codificantes se muestran en azul y los no codificantes en blanco, exones que sufren procesamiento alternativo aparecen en azul oscuro y aquellos mutuamente excluyentes en rojo. El DNA genómico está simbolizado por una línea continua que conecta los exones, por lo que no aparece en las secuencias de cDNA. Cuando la línea está interrumpida indicamos que es el final de la secuencia genómica conocida. La estructura génica de la Troponina T (arriba) y la Troponina I (abajo) están bien conservadas entre los dípteros, aunque algunas fusiones de exones son potencialmente interesantes (desaparición del exón 3 del gen AgTpnI). Aunque los genes de *Anopheles* poseen intrones más largos que los de *Drosophila*, la mayoría de los exones están conservados. En el caso de los exones 6 del gen TpnI se observan algunos de ellos marcados discontinuamente en rojo. En *D. subobscura* y *D. virilis* no disponemos de esas secuencias, y en *Anopheles* parecen haber perdido su funcionalidad. En el caso de *A. mellifera*, también se han localizado los exones alternativos 10A y 10B de la TpnT, y el 9 y cuatro exones de tipo 6 de la TpnI.

El gen *TpnI* también ha conservado la mayoría de sus características en las especies estudiadas. El exón alternativo 9 aparece en todas las especies, aunque no ocurre lo mismo con el exón 3, que no aparece en el gen de *Anopheles* hasta el punto de que los exones 2 y 4 están fusionados en un exón único. En *Apis* el exón 2 no está fusionado con el 4, aunque aún no hemos localizado el exón 3. En la región central de la *TpnI* aparece una región de alta variabilidad obtenida por procesamiento alternativo de varios exones 6 con el mismo tamaño y mutuamente excluyentes. Como se describió en la introducción, los exones 6a1(embrionario) y 6b1 (IFM) tienen especificidad de tejido y niveles de expresión más altos que los exones 6a2 y 6b2 en *D. melanogaster*, aunque todos ellos son detectables por Northern (Barbas y otros, 1993) o RT-PCR (datos no mostrados) en todos los tipos musculares. Como se muestra en la figura 22, la baja expresión de estos exones nos ha impedido el clonaje y posterior secuenciación del exón 6a2 en *D. subobscura* y de tanto 6a2 como 6b2 en *D. virilis*. En el gen *AgTpnI* hemos localizado hasta 5 posibles exones 6, aunque sólo 6a1, 6b1 y 6b2 mantienen un alto grado de conservación de secuencia con respecto a las secuencias de Drosophilidae. Curiosamente, en *Apis* hemos localizado cuatro exones de tipo 6, al igual que en Drosophilidae, aunque no se puede descartar que exista alguno más en la región aún no secuenciada que separa los dos alineamientos de secuencia que hemos obtenido.

### Características de los genes *TpnT* y *TpnI*. Análisis de secuencias

En la figura 23 se muestran varios alineamientos de las secuencias de los exones alternativos de estos genes en los insectos analizados y otros artrópodos (para la *TpnT*, los insectos *Libellula pulchella* y *Periplaneta americana* y para la *TpnI* el ácaro *Haemaphysalis longicornis*). La secuencia de la *TpnT* está conservada casi en un 100% en las regiones de la proteína codificadas por los exones constitutivos, y dentro de Drosophilidae incluso los exones alternativos mantienen la conservación de la secuencia. Los exones 10A y 10B retienen la mayor parte de la variabilidad de la proteína, aunque siguen estando muy bien conservados en Drosophilidae (figura 23B).

El mismo grado de conservación se encuentra en el gen *TpnI*. Aunque el exón 10 es constitutivo, la inclusión del exón 9 en el transcrito de la *TpnI* provoca un codón de parada utilizando las dos últimas bases del exón 9 y la primera del exón 10, por lo cual funcionan como si fueran exones mutuamente excluyentes. Sus secuencias están bien conservadas en Drosophilidae, pero los exones localizados en *Anopheles*, a pesar de tener una composición de aminoácidos similar, están menos conservados (figura 23C).



**FIGURA 23. Alineamientos de las regiones variables N<sup>4</sup> y C<sup>4</sup> de la TpnT y TpnI. A)** Conservación de la región variable N-terminal de la TpnT. Las secuencias están perfectamente conservadas en Drosophilidae, pero algunas variaciones aparecen en *Anopheles* y más aún en otros insectos. **B)** Región variable C-terminal de la TpnT. Esta región está muy bien conservada en Drosophilidae, aunque la comparación entre los exones 10A y 10B muestra poca conservación. La menor conservación de los exones de *Anopheles* y *Apis* sugiere que esta duplicación pudo producirse independientemente en la adquisición del mecanismo asincrónico de los IFMs en distintos órdenes de insectos, y no estar presente en otros insectos como *L. pulchella* o *P. americana* que carecen de este mecanismo asincrónico. **C)** Región variable C-terminal de la TpnI. Este alineamiento nos indica una tasa de variación similar a la de la región C-terminal de la TpnT. **D)** Alineamiento de la región variable N-terminal en la Troponina I. El exón 3 sólo está presente en Drosophilidae y contiene un número variable de repeticiones "PAANGKA" en un contexto rico en prolina y alanina similar al que se ha observado en la TmH (Mateos y otros, Enviado). Desgraciadamente las secuencias 5' y 3' terminales de la región codificante de la TpnI en *Apis* no han sido localizadas y no podemos comprobar la existencia de secuencias similares a las del exón 3 en este género de insectos.



Sin embargo lo más relevante en este sentido es la presencia del exón 3 en *Drosophilidae* (figura 23D). La secuencia codificada en este exón es rica en prolinas y alaninas, repitiéndose la héptada “PAANGKA”, y aunque no está linealmente conservada en *Drosophilidae*, las características del exón son similares en las especies.

En la figura 24A mostramos los árboles filogenéticos obtenidos a partir de la secuencia de nucleótidos o de la proteína correspondiente a los exones 6 de la Troponina I. Estos árboles ofrecen un aspecto similar a los que construimos con los genes Troponina C en la figura 17 en número de isoformas, tasa de evolución y patrones de expresión, sugiriendo una posible relación entre ellos. Los exones de tipo a1 y b1 al tener tasas de expresión mayores están más limitados en su evolución, mientras que el resto de los exones de tipo 6 han divergido rápidamente. Es interesante observar que el exón 6a2 en *Drosophilidae* ha evolucionado independientemente del exón 6a2 en *Apis*, al igual que ocurría con el gen DmTpnC1a (en *Apis* sólo existe un gen de Tipo I). El análisis de las secuencias genómicas del gen en *Drosophilidae* ha revelado una mutación en la región donadora del splicing en el exón 6a2, motivo por el que pensamos que este exón puede haber perdido su funcionalidad (figura 24B). El exón 6a2 en *Apis* mantiene conservada la secuencia donadora del splicing, corroborando su distinto origen con respecto al exón 6a2 de *Drosophilidae*. En *Anopheles*, el exón 6b3 y el exón 6a2 mantienen relativamente conservada la secuencia de cDNA, pero la secuencia proteica ha perdido completamente su funcionalidad por la inserción de codones de parada.

### Patrón de expresión diferencial de las isoformas de TpnT y TpnI

En la figura 25 se muestran los patrones de expresión detectados por RT-PCR de los genes TpnT y TpnI en *D. subobscura* y *D. virilis* en dos fracciones representativas del desarrollo de *Drosophila* (larvas y pupas) que contienen todos los transcritos descritos para estos genes. Todos ellos han sido localizados y poseen una expresión similar a la descrita para *D. melanogaster* (Barbas y otros, 1993, Benoist y otros, 1998). Combinaciones de los exones 3, 4 y 5 aparecen en los transcritos de la TpnT en músculos larvarios y abdominales discriminando entre ellos, mientras que el transcrito de los IFMs, ampliamente representado en el estadio de pupa, no presenta ninguno de estos exones alternativos. El exón 9 de la TpnI aparece exclusivamente en los músculos del adulto, acompañado o no del exón 3. La composición exónica de los transcritos de TpnT y TpnI que se expresan en cada músculo, así como los de la TpnC aparecen agrupados en la tabla 7.



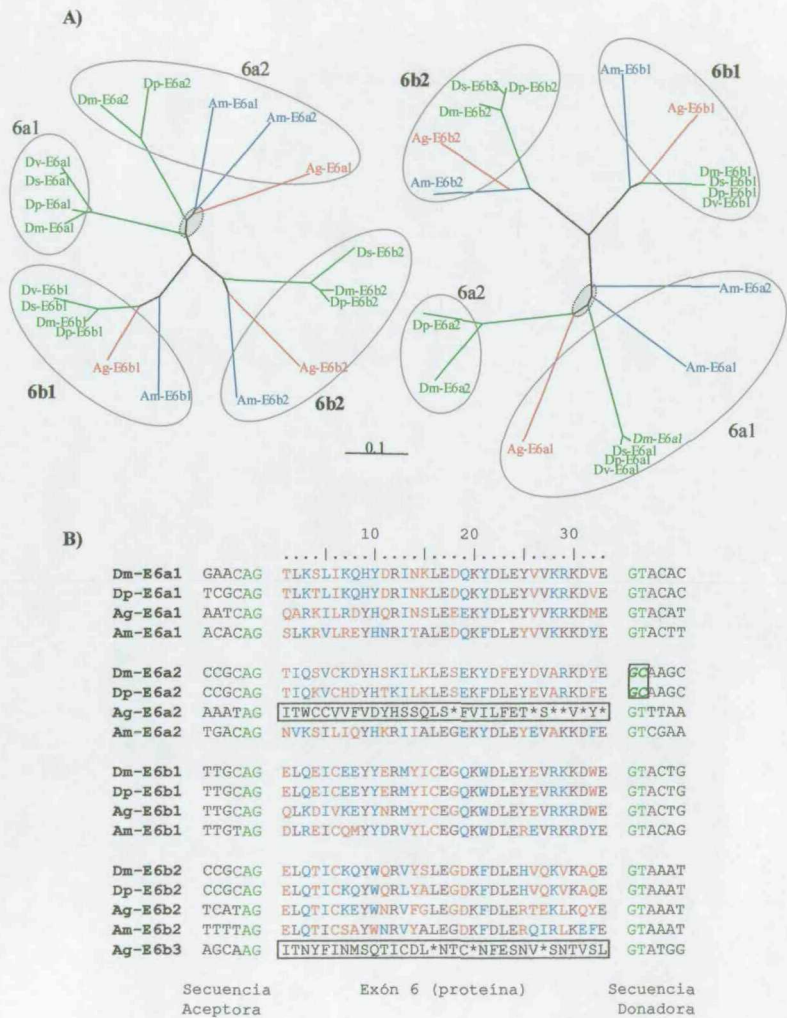


FIGURA 24. Propiedades de los exones 6 de la TpnI en insectos. A) Relaciones filogenéticas entre los exones 6 de la TpnI de insectos. Los exones de tipo 6a y 6b se comportan de una manera similar a los genes TpnC I y III (figura 17). B) Alineamientos de la secuencia proteica flanqueada por las regiones donadoras yceptoras de “splicing” de los exones de tipo 6 en insectos. Se observa claramente que los exones 6a1 y 6a2 se han originado independientemente en Drosophilidae y Apis.

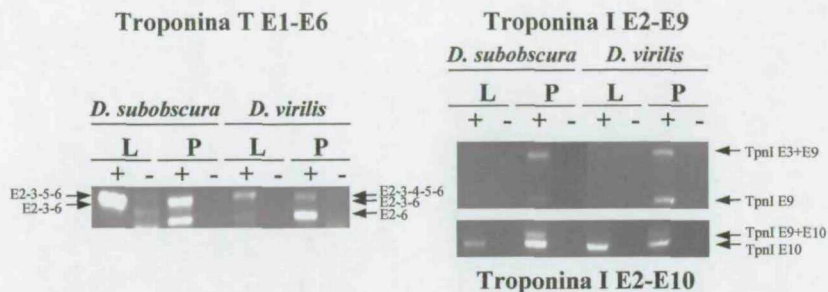


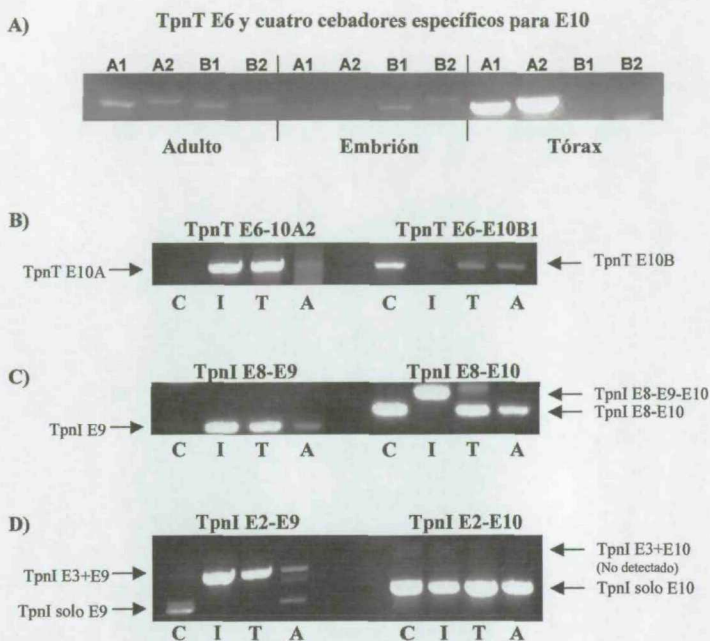
FIGURA 25. Conjunto de isoformas expresadas diferencialmente a lo largo del desarrollo para la Troponina T (izquierda) y la Troponina I (derecha). Mostramos el patrón de expresión de isoformas en larvas (L) o en adultos (similar al de pupas tardías (P)) para la TpnT y TpnI detectado por RT-PCR en *D. subobscura* y *D. virilis*. + y - representan la presencia o no de retrotranscriptasa. Las isoformas debidas a los exones alternativos, mutuamente excluyentes 10 para la TpnT y 6 para la TpnI tienen el mismo tamaño, por lo que son indistinguibles con este abordaje. Todas las isoformas esperadas han sido localizadas y con el mismo patrón de expresión que en *D. melanogaster*.

Exones alternativos TpnT			Exones alternativos TpnI			Genes TpnC	Expresión mayoritaria
3	4	5	3	6*	9		
+		+		6a2		Ib	Larva
+	+	+		6a1		Ia	Musc. Hipodérmico
+			?	?	?	II?	Conducto Dorsal?
			+	6b2/b1	+	IIIa-b	Adulto (IFM+TDT)

TABLA 7. Repertorio de isoformas previamente descrito para las Troponinas en *D. melanogaster*. Se muestran los transcritos detectados en diferentes estadios o tipos musculares por la presencia (+) o ausencia de exones alternativos. Datos obtenidos de Barbas y otros (1993), Benoist y otros (1998), y Herranz y otros (2003). No se habían localizado los transcritos específicos que discriminaran entre IFM y TDTs. El asterisco indica que el exón es mutuamente excluyente.

Hasta este momento no se había podido detectar ninguna diferencia entre los transcritos de la TpnT que se expresan en los músculos de vuelo y del salto. El descubrimiento del nuevo exón 10A ha permitido encontrar esa diferencia. En la figura 26 se muestran los transcritos que se están expresando diferencialmente en fibras musculares aisladas del tórax de *Drosophila*. En la figura 26A demostramos, utilizando un cebador del exón 6 (constitutivo) combinado con dos cebadores específicos para el exón 10A y otros dos para el exón 10B, que la expresión del exón 10B (caracterizado previamente) se produce tanto en embriones como en adultos, sin embargo el nuevo exón 10A es específico de adultos, y muestra niveles muy altos de expresión únicamente en el tórax de *Drosophila*. En la figura 26B se observa como esta expresión específica de tórax se detecta tanto en los IFMs como en los TDTs (al igual que ocurría con los genes TpnCIIIb) mientras que el exón 10B no es detectado en absoluto en los IFMs. Por lo tanto el transcrito específico de IFMs no contiene ningún exón alternativo de la región variable amino terminal (Exones 3 a 5, figura 25) y posee el exón 10A (figura 26B). Aunque este exón también es detectado en los TDTs pensamos que su expresión debe ser menor, al igual que ocurría con el gen TpnCIIIb en las hibridaciones in situ, teniendo en cuenta además que también se detectan transcritos que contienen el exón 10B en esta fracción.

Aunque se había detectado que el transcrito de la TpnI específico de IFMs contenía mayoritariamente el exón 6b1, quedaban dudas con respecto al resto de los exones alternativos de este gen (Exones 3 y 9) aunque se había descrito que al menos el exón 3 es específico de adultos (Barbas y otros, 1993) y nosotros hemos corroborado que el exón 9 también lo es. Utilizando cebadores específicos para amplificar por RT-PCR las regiones entre el exón 8 y el exón 9 o el exón 10 (figura 26C), hemos observado que si bien aparecen transcritos que contienen el exón 9 tanto en IFMs como en TDTs, en estos últimos su proporción con respecto a los transcritos que carecen de este exón alternativo es mínima. Por lo tanto el exón 9 es específico de los músculos indirectos de vuelo. Cuando sustituimos el cebador del exón 8 por el del exón 2 para poder detectar también la ausencia o presencia del exón alternativo 3 (figura 26D) observamos que el patrón de expresión del exón 3 está asociado al del exón 9, apareciendo mayoritariamente en los IFMs, no obstante se detecta una expresión residual de transcritos que contienen el exón 9 y no contienen el exón 3 en cabezas y abdómenes. Así mismo no se detecta ningún transcrito que contenga el exón 3 y el exón 10 simultáneamente.



**FIGURA 26. Diferencias en el patrón de expresión de los transcritos de TpnT y TpnI en la musculatura adulta de *Drosophila melanogaster*.** A) Patrón de expresión de los exones 10 mutuamente excluyentes de la TpnT detectado con un cebador del exón 6 y cuatro cebadores específicos del exón 10A o el 10B en extracciones de adultos, embriones o tóraces. El exón 10A se expresa sólo en adultos y muy intensamente en tóraces, mientras que el exón 10B es más general. B) Patrón de expresión en fracciones del adulto (cabeza (C), IFM (I), TDT (T) y abdomen (A)). Se utilizaron cebadores para los exones 6 y 10A o 10B de la TpnT. El exón 10B se expresa en todos los músculos del adulto excepto en los IFM. El exón 10A es específico de IFM aunque también se expresa en los TDT. C) Cebadores para la región 3' del gen TpnI se utilizaron en experimentos de RT-PCRs (Exón 8 a 9 y 8 a 10). El exón 9 se expresa sólo en el tórax, y es exclusivo en los IFM. El exón 9 utiliza los primeros dos residuos del exón 10 para generar un codón de parada, por lo que el cebador del exón 10 detecta como una banda de menor tamaño las isoformas que carecen del exón 9 y con una banda mayor las que poseen ambos exones. Aunque en los TDT se expresan isoformas con y sin el exón 9, la isoforma mayoritaria carece de este exón. D) Utilizando cebadores del exón 2 y del exón 9 o 10 de la TpnI detectamos por RT-PCR que las isoformas que contienen el exón 3 son específicas de tórax y siempre contienen también el exón 9. Los controles negativos para la retrotranscripción no mostraron ninguna banda y no se muestran.

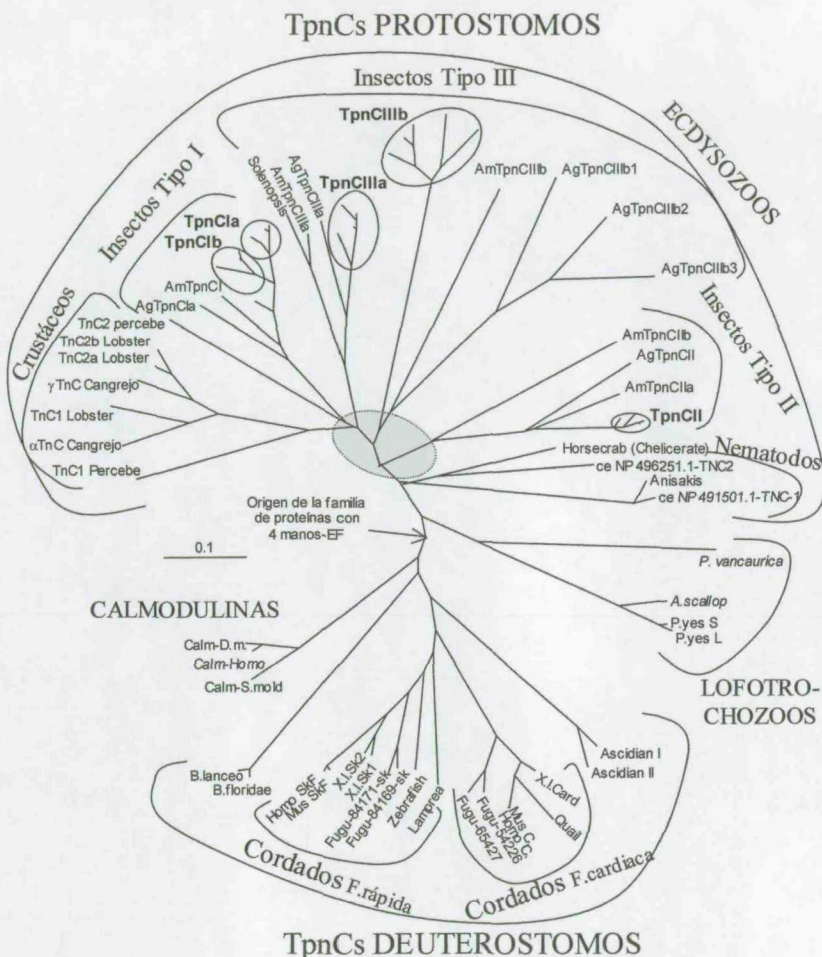


## DISCUSIÓN

### Historia evolutiva de los genes de la Troponina C

Establecido el complemento génico de Troponinas C para cada especie de insectos estudiados, nos debemos preguntar cómo se ha obtenido esta variabilidad génica tan alta, y si realmente se puede considerar que los genes que actualmente tienen las mismas propiedades funcionales (patrón de expresión y características de sus manos EF) en los diferentes insectos son verdaderos genes ortólogos o han evolucionado de una forma diferente en cada organismo a partir de distintos genes precursores para obtener, por convergencia, un repertorio similar de isoformas.

El origen evolutivo de las Troponinas C se remonta a la base de la diversificación de los metazoos. Los primeros estudios realizados en torno a la evolución y clasificación de proteínas con manos EF estaba centrado básicamente en vertebrados (Nakayama y Kretsinger, 1994, Kawasaki, Nakayama y Kretsinger, 1998). No obstante ya se describió que las Troponinas C de invertebrados no formaban parte de la familia CTER de proteínas con manos EF (Calmodulina, TpnC de vertebrados, cadena Esencial y cadena Reguladora de la miosina). De hecho, cuando se realiza un BLAST específico con una TpnC de vertebrados o de invertebrados aparecen los correspondientes genes TpnC del mismo grupo, pero separando ambos grupos aparecen otras proteínas con manos EF como la calmodulina o la cadena ligera de la miosina (mlc-1). Hemos confeccionado un árbol filogenético (figura 27) utilizando las secuencias proteicas de las Troponinas C secuenciadas en protostomos, algunas Troponinas C de los principales grupos dentro de los deuterostomos y tres Calmodulinas representativas de deuterostomos, ecdisozoos y lofotrochozoos. Para establecer el origen del árbol filogenético incluimos algunas cadenas ligeras de la miosina como "outgroup". Ambos grupos de TpnC aparecen claramente diferenciados en el árbol, estando el grupo de invertebrados mucho más diversificado. La aparición de las calmodulinas, más próxima al grupo de TpnC de deuterostomos, implica un origen muy temprano de las TpnCs de protostomos. Dentro de los protostomos, los lofotrochozoos (anélidos y moluscos) están muy bien diferenciados de los ecdisozoos (artrópodos y nemátodos), habiéndose producido la principal diversificación en la base de los insectos. Tanto los nemátodos como los crustáceos poseen varias isoformas de TpnC pero claramente han evolucionado a partir de un gen TpnC único en cada filo de organismos.

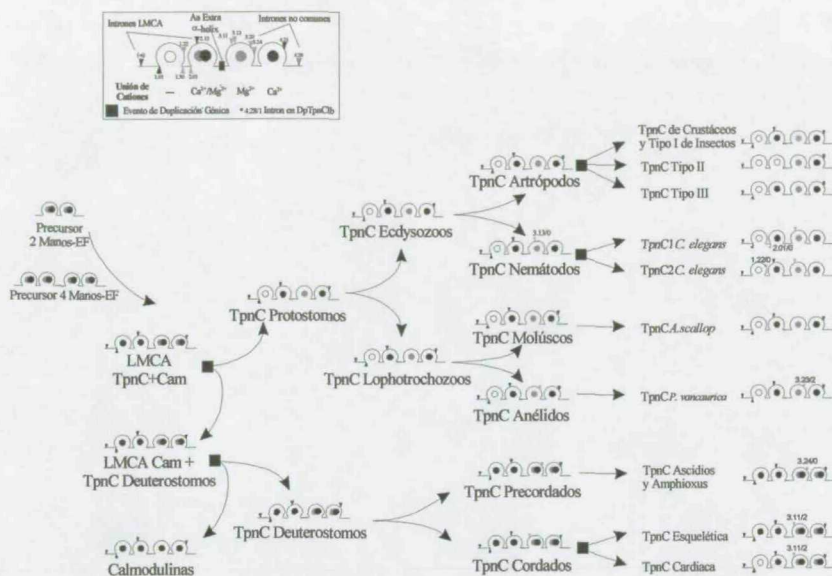


**FIGURA 27.** Árbol filogenético proteico sin raíz para 66 TpnCs y 3 calmodulinas representativas del reino animal. Hemos utilizado la proteína mcl1 de varias especies de *Drosophila* como “outgroup” para definir el nodo del árbol. Como se describe en el texto la separación de la TpnC de protostomos y deuterostomos se refleja claramente en el árbol. Mientras que en mamíferos sólo se ha seleccionado una duplicación del gen TpnC (isoforma esquelética rápida frente a isoforma lenta/cardíaca, con duplicaciones adicionales en los anfibios y peces teleosteos), la diversificación y especialización en insectos ha sido la norma. El origen monofilético de las TpnCs de artrópodos aparece reflejado en el árbol y en los valores bajos de bootstrap representados con una elipse gris. Los nombres de los genes de las especies de *Drosophila* han sido eliminados del árbol y sustituidos por círculos resaltando las ramificaciones. La escala indica la distancia medida en número de sustituciones por sitio (0.1).

Nuestro análisis nos hace proponer un modelo para la evolución de los genes TpnC en protostomos, especialmente en los insectos. Teniendo en cuenta la similitud de secuencia y función de las manos EF 1-3 y 2-4 inferimos que el precursor común de la TpnC y la Calmodulina se generó por duplicación de un precursor con dos manos EF (figura 28). Durante la evolución inicial de los metazoos, la afinidad calcio/magnesio en distintas duplicaciones de la gran familia de proteínas con cuatro manos EF cambió, y diversos grupos de genes divergieron, entre otros, la TpnC de protostomos, la calmodulina y la TpnC de deuterostomos. El precursor común de estos genes compartía el mismo grupo de intrones como sugirieron Yuasa y Takagi (Yuasa, Cox y Takagi, 1998, Yuasa y Takagi, 2000, 2001), todos los intrones localizados en los genes TpnC de vertebrados con excepción del intrón localizado en la tercera mano EF. Este precursor estaba localizado en la base de la diversificación que generaría las calmodulinas y más tarde la isoforma cardíaca/fibra esquelética lenta y la isoforma de músculo esquelético de fibra rápida. Duplicaciones adicionales de estos dos genes TpnC de vertebrados se dieron en el pez cebra y en los anfibios, debido a fenómenos relativamente recientes de duplicación de grandes segmentos genómicos en estos grupos.

La TpnC en la rama de los protostomos perdió la funcionalidad de la primera mano EF, mientras que la tercera mano EF decantaba su funcionalidad hacia la captación de cationes magnesio, posiblemente para fortalecer la interacción TpnC-TpnI en el complejo Troponina. Los genes TpnC de los lofotrochozoos han mantenido la posición relativa de sus intrones y sus manos EF han conservado esta funcionalidad. Dentro del grupo ecdysozoa, los nemátodos mantienen dos copias del gen TpnC, probablemente obtenidas a partir de un gen único. Estos genes han divergido rápidamente habiendo preservado escasa similitud entre ellos, quizás debido a la alta especialización del gen TpnC2 (específico de músculo faríngeo). Algo parecido aconteció con los genes TpnC de los artrópodos no insectos (crustáceos como el cangrejo o el quelicerado ancestral, cacerola de las molucas). Todas sus TpnCs se agrupan en una rama filogenética común sugiriendo que han evolucionado a partir de un gen ancestral único para todos los artrópodos. Los genomas de estos organismos no han sido secuenciados completamente, por lo que podría esperarse que aparecieran nuevos miembros de la familia TpnC con peculiaridades funcionales equivalentes a las de los genes de tipo II o III de insectos para poder dar cuenta de los diferentes tipos musculares que aparecen en un filo tan tremendamente diversificado como es el de los artrópodos.





**FIGURA 28.** Esquema general de la evolución de los genes TpnC en los Metazoos. Hemos utilizado toda la información disponible, patrones de expresión, posición de los intrones, conservación de la secuencia primaria y de las manos EF, para construir este esquema. A partir de un precursor con 2 manos EF se obtuvo, por duplicación y fusión, el precursor de la familia con cuatro manos EF. Este ancestro común de las TpnCs y calmodulinas de todos los metazoos (LMCA), poseía un repertorio determinado de intrones ((-n), 1.01, 2.13 y 4.21). Sucesivos eventos duplicativos (cuadro negro), dieron lugar al precursor de la TpnC de protostomos, la calmodulina y la TpnC de deuterostomos. Con un número relativamente bajo de cambios, la TpnC de deuterostomos y las calmodulinas han mantenido la mayoría de las propiedades que poseían esos precursores. El precursor de la TpnC de protostomos sufriría profundos cambios en las propiedades de sus manos EF, manteniendo la funcionalidad sólo de la segunda y cuarta manos EF, y dirigiendo la tercera mano EF hacia la captación de cationes magnesio. La especiación permitió que los diferentes genes TpnC en los protostomos evolucionaran independientemente. En los nemátodos y artrópodos nuevos episodios de duplicación génica añadieron una mayor diversificación a las TpnCs, hasta alcanzar el número de tres genes precursores de la Troponina C en insectos.



En la base de la diversificación de los insectos cabe esperar que existieran tres genes precursores de los genes TpnC y podemos inferir su historia evolutiva siguiendo los procesos de ganancia o pérdida de intrones en ellos. Inicialmente el precursor común de los genes TpnC de insectos sufrió una primera duplicación y divergió para generar el precursor de tipo I manteniendo los intrones 1.01 y 2.13 (tipo I de drosophilidae). El segundo gen perdió el intrón 2.13 y tras una segunda duplicación dio lugar al precursor de tipo III (genes tipo III de drosophilidae) y al de tipo II, que también perdió el intrón 1.01 y la funcionalidad de su segunda mano EF. Estos eventos sucedieron en la base de la diversificación de los insectos, al menos antes de la separación himenóptera-díptera (hace unos 300 millones de años, figura 29).

En el periodo en el que se estaban diversificando las diferentes especies de dípteros e himenópteros (300 a 250 millones de años) se especializaron los genes específicos del vuelo. Está descrito que la adquisición del mecanismo de contracción asincrónica en los IFMs se ha producido independientemente en varios grupos de insectos (Pringle, 1981, Dudley, 2000, Josephson, Malamud y Stokes, 2000). En el caso de los genes TpnC se eligieron distintos precursores para generar las isoformas específicas de IFMs en dípteros y en himenópteros. En *Apis mellifera* el precursor de tipo I se duplicó, uno de los genes incorporó un nuevo intrón (3.13/1) y asumió la función de gen tipo I (AmTpnCI). La secuencia de la otra copia, probablemente forzada por la adaptación al vuelo, divergió rápidamente de la del gen AmTpnCI y se duplicó a su vez para dar lugar a los genes AmTpnCIIIa y AmTpnCIIIb. Este último añadió un residuo de ácido glutámico adicional en su alfa-hélice central y se adaptó a la nueva función de los IFMs. En la rama de los dípteros los verdaderos genes de tipo III se generaron por sucesivas duplicaciones del precursor de tipo III. La primera de ellas se produjo antes de la separación entre *Anopheles* y *Drosophila*, separando un gen precursor de los genes IIIa que no sufrió cambios en sus manos EF o en sus intrones y un precursor de los genes IIIb. Este precursor IIIb incorporó el intrón adicional 4.28, y en el caso de *Anopheles* sufrió dos duplicaciones más para generar los tres genes IIIb del mosquito, que se diferenciaron en la región de estabilización por cationes magnesio.

El precursor de tipo III en *Apis* no se utilizó para obtener los genes de tipo III, por lo que acabó produciendo el gen AmTpnCIIIb. El precursor de tipo II generaría una copia de tipo II para cada especie, al igual que el precursor de tipo I, con la excepción de drosophilidae. Antes de que se diversificaran las especies de *Drosophila* estudiadas (hace unos 60 millones de años) el precursor de tipo I se duplicó generando los genes

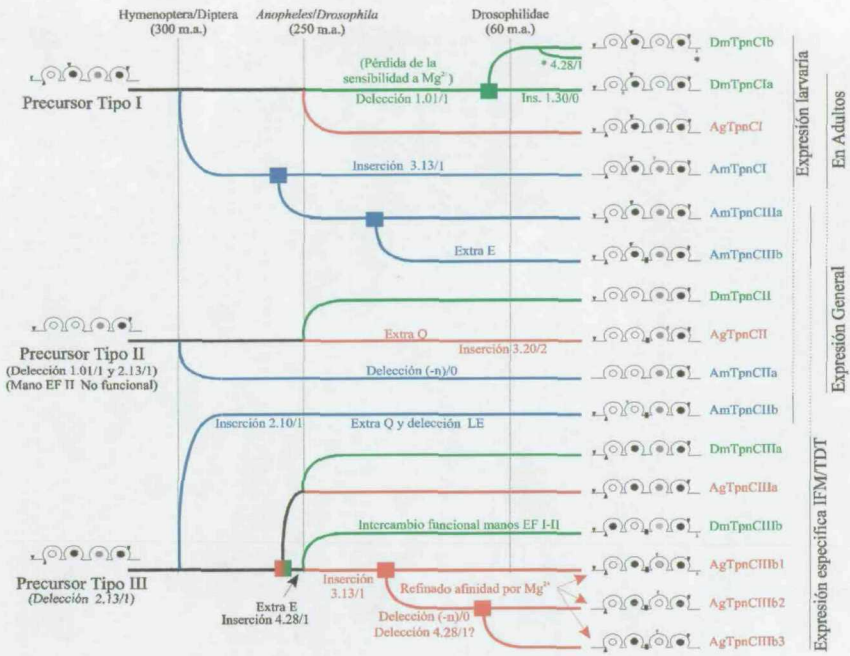


FIGURA 29. Diversificación evolutiva de los genes TpnC en insectos. Los eventos duplicativos (cuadros negros), la adición de residuos y la ganancia o pérdida de intrones están indicados, así como los patrones de expresión en *Drosophilidae* y *Apidae*. Después de la diversificación de los tres precursores TpnC de insectos, las posiciones de los intrones y las propiedades de sus manos EF cambiaron, dirigiendo cada gen a funciones más especializadas. Los genes de Tipo II acumularon un número relativamente bajo de variaciones, probablemente debido a su patrón de expresión más generalizado. El precursor de tipo I en *Apis* (Azul) y el de tipo III en *Anopheles* (Rojo) y *Drosophila* (Verde) sufrieron hasta tres eventos duplicativos independientes, suceso especialmente ejemplificado en *Anopheles*, para obtener la isoforma IIIa y tres isoformas de tipo IIIb, capaces de tener un papel de refinado en la función de los músculos indirectos de vuelo. Es reseñable como los genes de tipo III en *Apis* se han generado a partir de un precursor diferente que sus genes parálogos en dípteros.

TpnC1a y Ib. Las secuencias de estos genes están tan próximas en las especies utilizadas de *Drosophila* que utilizando cebadores específicos de un gen para una de las especies se puede amplificar preferentemente el gen parálogo en otra especie, sugiriendo que esta duplicación sucedió poco tiempo antes de la diversificación del grupo drosophilidae.

Teniendo en cuenta los datos de Drosophilidae, durante los últimos 60 millones de años los genes no han sufrido grandes variaciones a nivel de funcionalidad de las manos EF o de la posición de los intrones, aunque el gen TpnC1a en *D. pseudoobscura* posee el intrón 4.28/1 mientras que el mismo gen en *D. melanogaster* carece de él. Este intrón sólo introduce una variación en los últimos aminoácidos de la proteína y es por ello más flexible su evolución. Los genes AgTpnCIIIb2 y IIIb3 al igual que ocurre con los genes AmTpnCIIIa y IIIb están muy próximos en el genoma y su secuencia está bastante bien conservada para tener una función tan especializada en músculos de vuelo. Esto nos hace pensar que su diversificación ha sido más reciente que la de los genes IIIa y IIIb de los dípteros.

Estos datos hacen pensar que la gran diversificación observada en los genes de tipo III debe estar asociada al mecanismo de activación por estiramiento que se produce en los músculos indirectos de vuelo. Aunque los precursores génicos han sido diferentes, las secuencias han convergido hasta obtener una similitud de secuencia que puede inducir a pensar que son genes ortólogos. El número de genes implicados en el proceso parece estar asociado también a las necesidades de cada organismo. El pequeño mosquito *Anopheles* necesita mantener una frecuencia de batido (hasta 1000 Hz) mucho más alta que *Drosophila* (unos 200 Hz) para mantener el vuelo, por lo que posee tres copias del gen IIIb. Las mariposas (lepidópteros) en cambio tienen frecuencias de 4 Hz.

### **Coevolución de los genes del complejo Troponina**

En la Tabla 8 podemos observar la distribución final de los transcritos de los genes implicados en el complejo troponina una vez establecidas las isoformas específicas de los IFMs para todos ellos. Tal y como se ha presentado en la sección de resultados, los transcritos que contienen ciertos exones alternativos se están coexpresando, al menos en lo que se refiere a los músculos indirectos de vuelo. Los genes TpnT y TpnI, al ser genes únicos, han tenido que evolucionar utilizando el procesamiento alternativo de exones, siendo estos exones los que han sufrido el moldeado evolutivo. A la vista de la coexpresión de estos exones debemos inferir que la evolución de estos elementos modulares se ha realizado concertadamente.





En la figura 30 se han representado las relaciones que hemos establecido entre los diferentes exones alternativos del gen Troponina I con respecto a los genes TpnC y a los exones alternativos del gen Troponina T y la Tropomiosina. Los exones 6 de la TpnI no sólo tienen una relación con los genes TpnC en su número, sino también en su expresión génica. Los exones 6a se expresan junto con los genes TpnCI en los tejidos larvarios y en los músculos abdominales, y de manera análoga los exones 6b se expresan en los músculos del adulto como los genes TpnCIII, siendo el exón 6b1 y el gen TpnCIIIb los específicos de los IFMs. De hecho el repertorio de los genes de actina es también muy similar en número y patrón de expresión al de los genes TpnC (Lovato y otros, 2001), y se pueden clasificar utilizando la misma nomenclatura.

La TpnI y la TpnT están coexpresando también los exones 9 y 10A respectivamente en los IFMs, mientras que en el resto del adulto y en los músculos larvarios se expresan los exones 10 (TpnI) y 10B (TpnT). Una tercera relación se puede encontrar entre el exón 3 de la TpnI y la Tropomiosina H (isoforma específica de IFMs de la Tropomiosina) y por otro lado la región variable amino terminal de la TpnT (exones 3, 4 y 5) con la Tropomiosina sin la extensión característica de la TmH. De hecho la TmH es el producto de la adición de un exón adicional en la parte carboxilo terminal de la Tm (Mateos y otros, Enviado)), provocando la elongación de la proteína con una secuencia que contiene la héptada repetida "APPAEGA", una secuencia tan rica en prolina y alanina como la que está codificando el exón 3 de la TpnI en *Drosophilidae* ("PAANGKA").

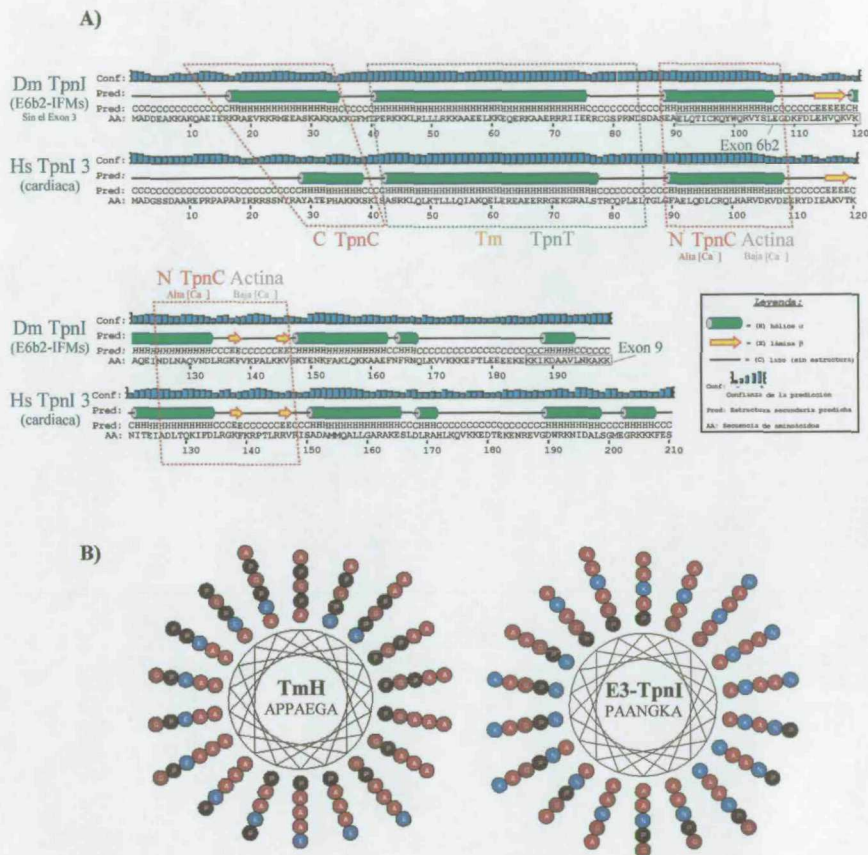
Todas estas relaciones no sólo se sustentan en la coexpresión de los respectivos transcritos, sino también en la tasa de variación de secuencia que se ha acumulado en cada dominio. Mientras que la mayoría de las regiones han variado relativamente poco, las tasas de variabilidad encontradas en los genes TpnC y los exones 6 de la TpnI son muy elevadas (entorno al 50-60% de similitud entre las secuencias). Por otro lado hay un mayor número de exones 6b en el gen TpnI y genes TpnCIII en *Anopheles*, y los exones 6a2 de la TpnI de *Drosophilidae* y *Apis* han evolucionado independientemente al igual que los genes TpnCIa de *Drosophilidae* y TpnCIIa de *Apis*. Estos datos nos hacen pensar que la evolución de estos dos grupos de secuencias están asociadas entre sí, y también con los genes de actina, aunque estos últimos han acumulado poca variación en su secuencia debido a las fuertes restricciones estructurales que posee esta proteína.

### **Un modelo funcional integrador del repertorio de isoformas de los genes Troponina en los distintos tipos musculares de *Drosophila***

La coevolución de los tres componentes del complejo Troponina, incluso de los genes de Actina y de la Tropomiosina no es sorprendente si tenemos en cuenta que su funcionalidad está claramente limitada por las interacciones que estos componentes tienen que establecer en el filamento fino del músculo de los insectos. Todas estas isoformas tienen que estar interaccionando en el complejo Troponina, respondiendo conformacionalmente a las variaciones en los niveles de calcio intracelular.

En vertebrados existe bastante información estructural para este complejo, de hecho se conocen las regiones de cada proteína que están interaccionando con las demás tanto en alta como en baja concentración de calcio (Filatov y otros, 1999, Gordon, Homsher y Regnier, 2000, Gordon, Regnier y Homsher, 2001). También existe información estructural, aunque mucho menos concreta, en el insecto *Lethocerus indicus* (Wendt, Guenebaut y Leonard, 1997, Wendt y Leonard, 1999). Modelos tridimensionales para la estructura de la TpnC pudieron ser realizados dado que esta proteína, en vertebrados, ha podido ser cristalizada. La estructura tridimensional de la TpnT y la TpnI en vertebrados comienza a ser desvelada (Takeda y otros, 2003), pero aún no se dispone de cristales con la estructura completa, por lo que hemos empleado el programa PSIPRED para predecir la estructura secundaria de ambas proteínas, tanto en *Drosophila* como en humanos, en los cuales se conocen las regiones de interacción entre las proteínas. Hemos detectado que las estructuras predichas para las proteínas, a pesar de que la secuencia primaria no siempre está bien conservada, es muy similar en los dos organismos, de modo que podemos construir un modelo extrapolando las regiones que van a estar interaccionando en el complejo Troponina de insectos. Un ejemplo de estos resultados se puede observar en la figura 31A para las isoformas asincrónicas de TpnI. Del mismo modo, utilizando el programa Bioedit realizamos un modelo de estructura en alfa-hélice para las héptadas repetidas del fragmento de la TpnI correspondiente al exón 3 y la elongación de la TmH (figura 31B). La repetición de estas héptadas sugiere una posible interacción coiled-coil entre ellas.

Con toda esta información hemos confeccionado un modelo para las interacciones de estas proteínas en diferentes tejidos musculares y en estado activo (alta concentración de calcio) o relajado. En la parte superior de la figura 32 se muestra el modelo para la disposición de los componentes del complejo troponina en los músculos



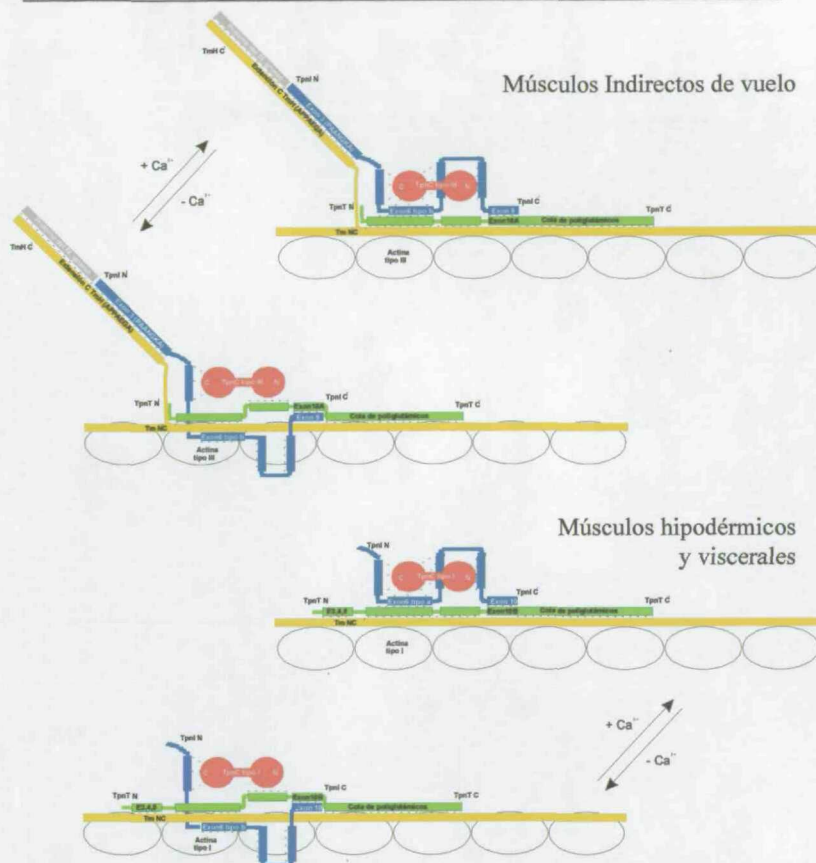
**FIGURA 31. Predicción de estructuras secundarias para la TpnT y TpnI.** A) Comparación entre las predicciones de estructura secundaria de la TpnI cardíaca en mamíferos y la isoforma de IFMs de *Drosophila* (sin la región del exón 3, sin estructura secundaria, para simplificar la figura). Aunque la secuencia no está bien conservada entre estas dos proteínas, las estructuras secundarias sí lo están, y hemos extrapolado las interacciones conocidas en mamíferos a *Drosophila*, observando que las regiones codificadas por exones alternativos tienen un importante papel en las interacciones. B) Diagrama helicoidal para las héptadas repetidas codificadas en el exón 3 de la TpnI y el exón 15 de la TmH. Estas secuencias son compatibles con una estructura secundaria de coiled-coil.



hipodérmicos y viscerales, inferida a partir de la estructura en mamíferos, y con una disposición muy similar. En condiciones basales de calcio la región codificada por el exón 6 de la TpnI coopera con la Tropomiosina inhibiendo la actividad de la actomiosina ATPasa, bloqueando el sitio de interacción actina-miosina. Esta inhibición es retirada cuando la concentración de calcio aumenta. En este caso la TpnC (tipo I) cambia su conformación al capturar el calcio e interacciona con el exón 6 (tipo a) de la TpnI, provocando un desplazamiento de la Tropomiosina con respecto al filamento de actina y exponiendo el sitio de interacción actina-miosina. La integridad del complejo está permanentemente estabilizada por la interacción de las regiones carboxilo terminales de la TpnI y de la TpnT (codificadas en los exones 10 y 10B respectivamente), y también por la interacción entre una región constitutiva de la TpnI (exones 4-5) y el dominio globular carboxilo terminal de la TpnC. La TpnT está interaccionando con la Tropomiosina utilizando principalmente su región central, pero tanto la cola de poliglutámicos (exón 11) como la región amino terminal (codificada por los exones alternativos 3, 4 y 5, y también rica en ácidos glutámicos) pueden estabilizar esta interacción. Se ha descrito que la TpnT es capaz de unir calcio en *Drosophila* (Domingo y otros, 1998), por lo que pensamos que estas regiones ácidas podrían estar implicadas en el proceso y contribuir a los cambios conformacionales que promueven la activación de la contracción muscular.

En la parte inferior de la figura 32 se muestra un modelo similar para los componentes del filamento fino en los músculos asincrónicos del vuelo. Como se ha descrito en esta memoria este tipo muscular posee isoformas muy específicas que deben estar implicadas en la diferente funcionalidad de estos músculos. En este modelo la TpnT y la TpnI utilizan los exones 10A y 9 respectivamente para mantener sus interacciones permanentes. La TpnI utiliza el exón 6 (tipo b) para interaccionar con la TpnC o con las actinas (dependiendo de los niveles de calcio), en ambos casos utilizando las isoformas de tipo IIIb. En este tipo muscular la Troponina T carece de la región amino terminal rica en ácidos glutámicos (exones 3 a 5), pero a cambio la TpnI y la Tm poseen isoformas con prolongaciones ricas en prolinas y alaninas. En nuestro modelo proponemos que estos dos componentes podrían interaccionar formando una estructura coiled-coil, que podría incluso conectar el filamento fino con alguna proteína del filamento grueso. Este puente podría estar implicado en el fenómeno de “activación por estiramiento”, actuando como un resorte molecular que promoviera mayores eventos contráctiles que impulsos nerviosos llegan al músculo.





**Figura 32. Modelo para las interacciones en el complejo Troponina de los músculos de *Drosophila*.** En la parte superior vemos el modelo para los músculos indirectos de vuelo y en la parte inferior para los músculos hipodérmicos y viscerales, tanto en estado activo (alta concentración de calcio) como inactivo. Se representa cada proteína con un color diferencial (rojo TpnC, azul TpnI, verde TpnT, naranja Tm y blanco Actina) y con los dominios implicados en las interacciones resaltados con cajas. Cuando los dominios que interaccionan están codificados por un exón alternativo aparece indicado. Interacciones directas o estabilizantes entre los dominios están indicadas con líneas de puntos. Como se describe en el texto, las diferencias más importantes son el tipo de isoformas expresadas (tipo III o I para la TpnC y Actina, exones 6b o 6a para la TpnI, y los exones mutuamente excluyentes de la región Ct de TpnT y TpnI) y las prolongaciones de la TpnI y la TmH en los IFMs, que pueden interaccionar formando una estructura coiled-coil, incluso interaccionando con una tercera proteína del filamento grueso y estableciendo así un puente flexible entre filamentos que promueva la contracción asincrónica.

En el caso de los músculos del salto (TDT) tenemos que proponer un modelo intermedio. Aunque las extensiones de la TpnI y la TmH no están presentes en este tipo muscular, sí que se pueden localizar en él isoformas de TpnC tipo III (IIIa) y exones 6b de la TpnI. Ambos exones mutuamente excluyentes 9 y 10 de la TpnI y 10A y 10B de la TpnT, se expresan en este músculo, si bien parece que las isoformas de IFMs lo hacen con un nivel muy bajo de expresión. Una posible explicación para esta dualidad en el tipo de isoformas expresadas en los TDTs puede residir en que, a pesar de que este músculo tiene un mecanismo de contracción convencional, su contracción es necesaria cuando *Drosophila* necesita “despegar”, por lo que deben activarse a la vez que los músculos del vuelo.

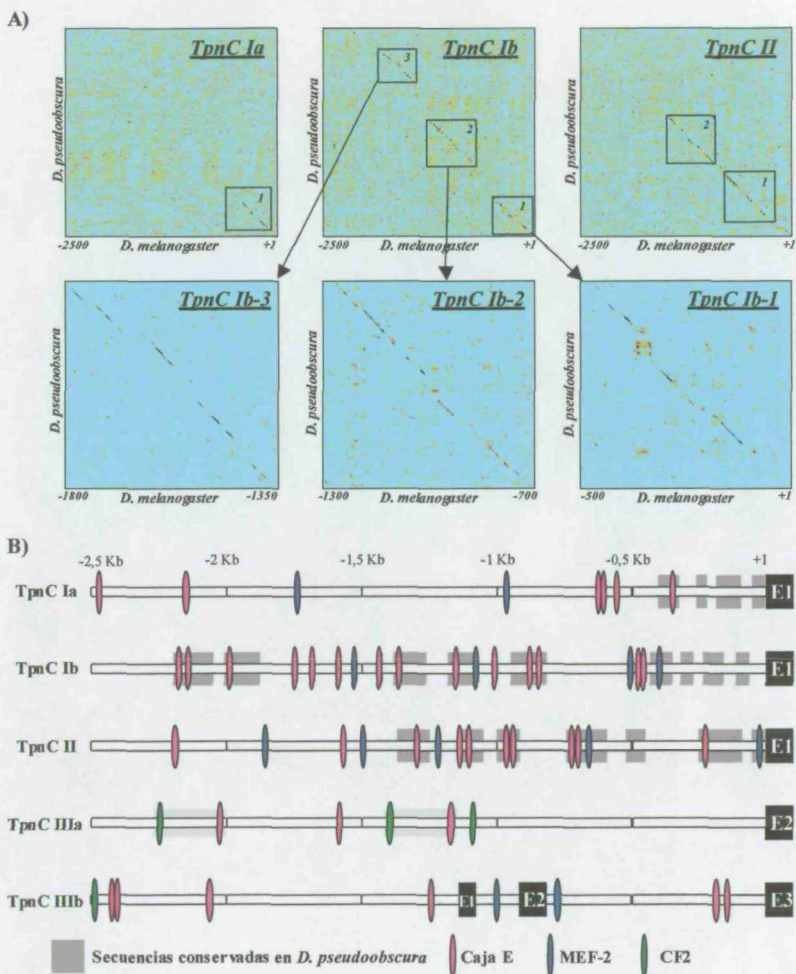
Aunque la mayoría de los exones alternativos de las Troponinas en *Drosophila* están conservados en otros insectos, el puente molecular propuesto en el modelo no puede ser similar en otras especies. Mientras que en *Drosophila* se han localizado dos exones alternativos que producen la prolongación de la TmH (exones 15 y 16 del gen Tm1), en *Anopheles* sólo se ha podido localizar uno de estos exones (Mateos y otros, Enviado). El exón 3 de la Troponina I sólo aparece en las Drosophilidae, no habiendo sido localizado en *Anopheles*, a pesar de ser un díptero. Desgraciadamente no disponemos de la secuencia de este exón en *Apis mellifera*, dado que el programa de secuenciación de esta especie aún no ha concluido, pero existen informaciones sugiriendo que en el caso de *Lethocerus indicus*, un hemíptero, la prolongación detectada en la Tm de *Drosophila* realmente está asociada al gen TpnI (Qiu y otros, 2003), como ya se ha descrito para otros géneros de insectos (Peckham y otros, 1992). Una vez más parece ponerse de manifiesto que dentro de cada género de insectos la adquisición de los mecanismos que controlan la contracción asincrónica de los IFMs se ha producido de forma independiente (Pringle, 1981, Dudley, 2000, Josephson, Malamud y Stokes, 2000), utilizando el mismo tipo de módulos moleculares pero aplicándolos sobre diferentes miembros del filamento fino. La situación expuesta para los genes Troponina C y los exones 6 de los genes Troponina I también corrobora la alta plasticidad de los componentes del filamento fino, evolucionando a partir de precursores diferentes para obtener un repertorio final de genes y exones, que por convergencia alcanzan funciones similares. Un estudio similar con los genes Actina podría corroborar los fenómenos evolutivos comentados en esta memoria.

### Perspectivas: Conservación de las regiones promotoras de la transcripción

Durante una investigación, cada nuevo resultado que se obtiene ayuda a clarificar las ideas que se tenían previamente sobre el objeto de estudio de la misma, pero a la vez sugiere nuevas preguntas que deben ser respondidas. A la vista de la interacción de todos estos elementos del filamento fino y de la coexpresión que deben sufrir para aparecer correctamente expresados en los distintos tipos musculares, debe existir un mecanismo que controle la regulación de la expresión de todos estos genes simultáneamente. La regulación de la expresión de los genes TpnT y TpnI ha sido exhaustivamente estudiada y comparada recientemente (Marín, Rodríguez y Ferrús, En prensa, Mas, García-Zaragoza y Cervera, En prensa), por lo que un estudio similar debería realizarse con los genes Troponina C.

El primer paso en este camino es la comparación de las secuencias promotoras y de los intrones 1 (cuando tienen un tamaño suficiente para poder contener secuencias reguladoras) en los genes TpnC de los insectos estudiados. La conservación de secuencias en estas regiones no codificantes pueden implicar su importancia en el control de la regulación de la transcripción de estos genes. Hemos obtenido las 2,5 kilobases anteriores al inicio de la transcripción de los genes Ia, Ib y II en *D. pseudoobscura* y los hemos comparado con las regiones correspondientes en *D. melanogaster* (figura 33A). Los genes de tipo III poseen intrones 1 de gran tamaño, pero estas secuencias todavía no están disponibles para *D. pseudoobscura* (disponemos de 2 kb del intron 1 para el gen IIIb y sólo 500 bp para el gen IIIa) por lo que esas comparaciones no se han podido realizar.

Este análisis preliminar indica que en los genes estudiados se encuentran zonas conservadas en los promotores agrupadas en pequeños dominios. Es interesante que el gen Ib, con un patrón de expresión más restringido a la musculatura larvaria de *Drosophila* posee tres regiones conservadas extendidas a lo largo de las primeras 2,2 Kb del promotor, mientras que el gen Ia, con un patrón de expresión más general, sólo cuenta con una pequeña región conservada en las primeras 400 bp del promotor. También hemos intentado localizar secuencias conocidas como sitios de unión para factores de transcripción musculares ya detectados en la regulación de la TpnT y la TpnI (figura 33B), y aunque hemos localizado algunos posibles sitios de unión para MEF-2 y factores bHLH, no podemos comparar estos resultados preliminares con los trabajos funcionales realizados con la TpnT y la TpnI (Marín, Rodríguez y Ferrús, En prensa, Mas, García-Zaragoza y Cervera, En prensa).



**FIGURA 33. Elementos conservados en las regiones reguladoras de la transcripción de los genes TpnC. A)** Matrices de identidad entre las secuencias reguladoras de *D. melanogaster* y *D. pseudoobscura* para los genes TpnC de tipo I y II. Se destacan en la fila inferior las tres zonas conservadas localizadas en el promotor del gen *DmTpnC Ib*. **B)** Mapa de los promotores de los genes TpnC con las regiones conservadas entre las dos especies de *Drosophila* y algunos elementos candidatos a regular la transcripción indicados en él. Es interesante que en la región intrónica del gen IIIa aparece un dominio duplicado que contiene un elemento CF2 y una caja E a una distancia conservada.



Sin embargo estos primeros análisis podrían ser útiles para el diseño experimental de las construcciones necesarias para el estudio de la regulación de la transcripción de estos genes. Por ejemplo, en el caso del gen DmTpnC1b, sería aconsejable diseñar varias construcciones distintas que cubrieran los tres dominios conservados que se muestran en la figura 33.

### **Perspectivas: Análisis a nivel proteico del complejo Troponina**

El estudio presentado en esta memoria se centra básicamente en el estudio de los genes del complejo Troponina, pero muchas cuestiones deberían ser analizadas a nivel proteico. Algunos experimentos que podrían realizarse, a parte de la identificación inequívoca de las diferentes isoformas de Troponina I y Troponina C por electroforesis bidimensional, serían experimentos de inmunoprecipitación para detectar qué elementos están realmente interaccionando entre sí en el complejo Troponina. Estos resultados podrían confirmar las teorías que hemos propuesto en los modelos funcionales.

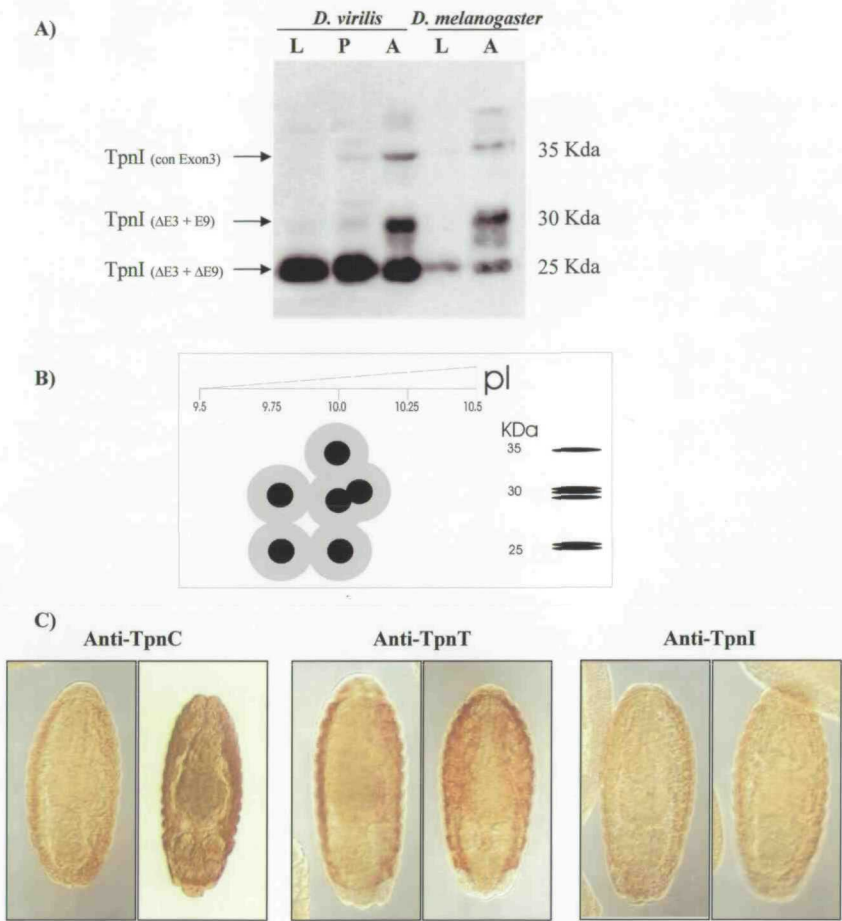
El primer paso para realizar estos experimentos es la disponibilidad de anticuerpos capaces de reconocer estas proteínas. Para la Tropomiosina disponemos en el laboratorio de dos anticuerpos monoclonales que reconocen diferencialmente todas las tropomiosinas o sólo la prolongación carboxilo terminal de la TmH. Su mutua interacción en el filamento fino ya ha sido estudiada y descrita en la memoria de tesis del Dr. Jesús Mateos, e incluso ha sido reexaminada para su publicación (Mateos y otros, Enviado). Anticuerpos policlonales generados en nuestro laboratorio son capaces de reconocer la TpnT y la TpnC, pero no disponíamos de grandes cantidades de anticuerpo que reconocieran la TpnI (algunas alícuotas del mismo fueron proporcionadas por el Dr. Alberto Ferrús). Esto provocó que intentáramos generar un anticuerpo policlonal específico para la TpnI en nuestro laboratorio.

Para ello realizamos una serie de construcciones a partir del transcrito de menor tamaño de la TpnI (no contiene ningún exón alternativo, por lo que debería ser capaz de reconocer todas las isoformas con una afinidad similar) de *Drosophila*, insertadas en fase con una proteína de fusión (proteína de unión a maltosa, MBP). Se inoculó un conejo con la proteína de fusión durante 7 semanas y tras comprobar cada semana que el suero del conejo era capaz de reconocer la proteína de fusión cada vez con mayor afinidad, se extrajo y purificó el suero.

En la figura 34A se puede observar un Western blot en el que el anticuerpo generado permite reconocer tres bandas en un extracto proteico de *Drosophilidae*, ajustándose a los pesos moleculares esperados para los productos de los transcritos localizados en *Drosophila*. Aunque no aparece reflejado en la figura, este anticuerpo también es capaz de reconocer la TpnI del cangrejo de río, proteína con alta similitud a la TpnI de *Drosophila* y que se utilizó junto con la proteína recombinante para testar la actividad del anticuerpo durante las semanas de la inmunización.

En contraste, cuando hemos intentado localizar las isoformas de TpnI en geles bidimensionales no hemos conseguido ningún resultado. Una posible explicación puede estar basada en la alta alcalinidad de la Troponina I, con puntos isoelectricos teóricos de entorno a 10 (figura 34B), muy próximos al límite de detección del sistema de anfolitos inmovilizados utilizado para estos experimentos (pH de 3 a 10 o de 6 a 11).

También hemos ensayado este anticuerpo por inmunocitoquímica en embriones. Comparando el resultado con un anticuerpo contra la TpnT que reconoce muy eficientemente el sistema muscular del embrión puede parecer que el anticuerpo contra la TpnI está funcionando deficitariamente. Sin embargo este anticuerpo es capaz de detectar, aunque muy débilmente, las fibras musculares del sistema muscular embrionario de *Drosophila* (figura 34C). Una vez resueltos estos problemas técnicos deberíamos tener a nuestra disposición un repertorio de anticuerpos que nos capacitarían para abordar los experimentos que corroborarían las informaciones de nuestros modelos funcionales.



**FIGURA 34. Actividad del anticuerpo policlonal anti-TpnI generado en el laboratorio. A)** Detección por Western-Blot de los tres grupos de transcritos predichos a partir de la información de cDNA. La banda inferior es la única que se detecta en larvas, siendo las otras dos bandas específicas de adulto (están traducidas a partir de transcritos con el exón 3 y/o el exón 9). **B)** Apariencia teórica de las isoformas de TpnI en una electroforesis bidimensional (separación horizontal por punto isoeléctrico y vertical por peso molecular). El punto negro indica una separación óptima, y el gris una más realista. No hemos conseguido detectar ningún punto en geles bidimensionales con este anticuerpo. **C)** Inmunotinción del sistema muscular de *Drosophila* con anticuerpos contra las Troponinas. Aunque la señal detectada con el anticuerpo contra la TpnT es mucho más intensa, el anticuerpo anti-TpnI es capaz de detectar las fibras musculares hipodérmicas del embrión de *Drosophila*.

## CONCLUSIONES

En esta memoria hemos suministrado todos los datos que nos han permitido resolver las cuestiones propuestas en los objetivos de esta tesis. Las conclusiones que hemos obtenido son las siguientes:

- 1ª El número de genes que integran el complemento génico de la TpnC en *D. melanogaster* es de cinco, y se expresan diferencialmente dependiendo del tipo molecular al que pertenecen, siendo los genes de tipo I mayoritariamente expresados en músculos larvarios e hipodérmicos y los de tipo III específicos de adulto.
- 2ª El análisis de las secuencias primarias, las manos EF y la posición relativa de los intrones en varias especies de insectos ha corroborado la clasificación de los genes TpnC en tres grupos.
- 3ª Estos mismos análisis han demostrado que los genes TpnC en dípteros e himenópteros se han diversificado de manera independiente, aunque han alcanzado un repertorio final de isoformas muy similares.
- 4ª Hemos identificado nuevos exones alternativos para los genes TpnT y TpnI, diferencialmente expresados en los músculos indirectos de vuelo de *Drosophila melanogaster*.
- 5ª El análisis de las secuencias variables de estos genes en varias especies de insectos ha revelado una posible coevolución de los componentes del complejo Troponina.
- 6ª Predicciones de la estructura de las troponinas, asociadas a los datos de coexpresión y coevolución de isoformas, nos han permitido proponer un modelo funcional del Complejo Troponina en *Drosophila* muy similar al de mamíferos.
- 7ª El modelo propuesto para los músculos asincrónicos indirectos de vuelo integra todas las isoformas expresadas en estos músculos, aportando una base molecular que puede estar implicada en el fenómeno de activación por estiramiento.



## ANEXO. La Línea de Investigación “Microgravedad” y Publicaciones.

Esta memoria de tesis ha sido escrita con un formato monotemático para poder tratar en profundidad la línea de investigación “Troponinas” en la que he estado trabajando de una manera continua desde mi incorporación al laboratorio del Dr. Marco. Sin embargo, me parece importante dedicar unas páginas a comentar de manera breve mi contribución a los experimentos de respuesta a microgravedad de *Drosophila* dentro del marco de la beca FPI “Hacia el establecimiento de una colonia permanente de *Drosophila* en la Estación Espacial Internacional (ISS)” en los que he participado dependiendo de la disponibilidad o no de vuelos espaciales y que, por un lado me ha financiado estos años y por otro me ha aportado experiencia adicional y publicaciones.

### Desarrollo de técnicas de fijación para la preservación de muestras en la ISS

Los dos mayores obstáculos para la investigación en la ISS es la automatización y la accesibilidad a las muestras. Los tripulantes de la estación no pueden dedicar mucho tiempo a los experimentos (actualmente, y tras el accidente del “Columbia” se mantienen una tripulación mínima de astronautas (máximo de tres) dado que solo existe una nave Soyuz de salvamento anclada en la ISS), por lo que en nuestro laboratorio se ha puesto a punto una unidad de cultivo automatizada de *Drosophila* que permite mantener una población permanente de pequeños insectos con el único requerimiento de reemplazar el tambor que proporciona la comida una vez cada dos semanas (Herranz y otros, 2002). El problema de la accesibilidad a las muestras radica en la limitación de los vuelos que traerán las muestras de regreso a la tierra para su análisis. Estos vuelos ocurrirán con una frecuencia mínima de 3 meses, por lo que hay que preservar las muestras en la estación espacial durante este tiempo con los mínimos requerimientos de energía, participación de la tripulación en los experimentos y evitando sustancias peligrosas como el formaldehído.

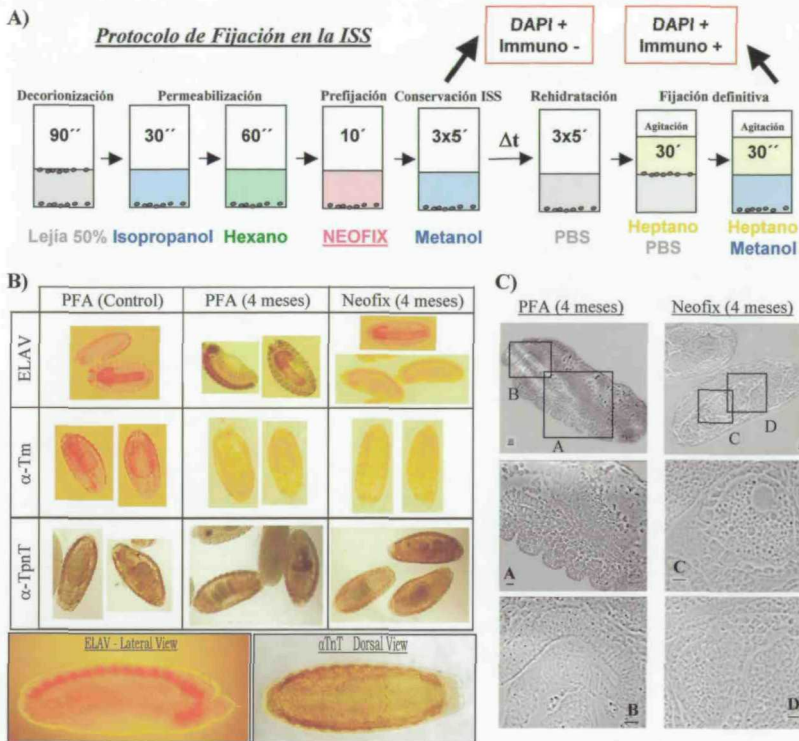
El Dr. David Husson durante su estancia en el laboratorio del Dr. Marco (2000-2001) puso a punto un protocolo de fijación de embriones de *Drosophila* libre de aldehídos. Se basa en la permeabilización del embrión con isopropanol y hexano y posterior prefijación con Neofix© (basado en alcoholes, ver figura A1). Este protocolo es fácilmente adaptable a las condiciones de microgravedad y sólo requiere 30 minutos. Las muestras pueden ser conservadas en este punto a 4°C durante meses y fijadas

definitivamente siguiendo el protocolo de Steponkus-Cadwell (Lynch y otros, 1989) cuando regresen de la ISS.

Mi contribución a este proyecto fue el testado tanto de dos anticuerpos monoclonales (ELAV y anti-Tm, detectan el sistema nervioso y el muscular) como de uno policlonal (anti-TpnT) en experimentos de inmunocitoquímica con muestras fijadas con los dos métodos propuestos y conservadas a 4°C o a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la figura A1. El nuevo método de fijación no es tan bueno como el clásico (basado en formaldehído), pero nos permite recuperar la señal de los anticuerpos incluso 16 semanas después de la prefijación con Neofix®. La conservación a 4°C es un requerimiento importante, pues conservado a temperatura ambiente sólo se recupera una débil señal en el 10% de los embriones (no mostrado).

La conservación de adultos y embriones para obtención de datos moleculares (ácidos nucleicos, proteínas) puede ser realizada por desecación con acetona. Las muestras se pueden conservar incluso siete meses a -20°C, con una pérdida en la eficiencia de la extracción del 50% si se conserva a 4°C (aunque sigue manteniendo una buena calidad, dado que se pueden detectar las isoformas de TpnC mayoritarias en cada tejido muscular (Herranz y otros, 2002)). A nivel ultraestructural, y en colaboración con el Dr. Medina (CIB-CSIC, Madrid), determinamos que aunque los cortes semifinos de 2 micras sugieren una buena conservación de las muestras (figura A1), los experimentos de microscopía electrónica revelaron una mala conservación ultraestructural en las muestras fijadas con Neofix®.

Una versión breve de estos resultados ha sido publicada en el artículo que adjunto, "Towards the establishment of a permanent colony of *Drosophila* in the International Space Station: Hardware and adaptation of techniques", firmado por Herranz, R., D. Husson, M. Pastor, C. Diaz, J. Mateos, A. Villa, F. J. Medina y R. Marco publicado en el Journal of Gravitational Physiology 9(1) durante el año 2002. Esta es una publicación derivada de mi participación en el 8<sup>th</sup> European Symposium on Life Sciences Research in Space: "Life in Space for Life on Earth" (Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden), 2 / 7 Junio 2002 ). Estos resultados también se han incluido en el capítulo "*Drosophila melanogaster and the Future of "Evo-Devo" Biology in Space. Challenges and Problems in the path of an eventual colonization project outside the Earth*" firmado por Marco, R., D. Husson, R. Herranz, J. Mateos y F. J. Medina publicado en el libro Advances in Space Biology and Medicine (2003).



**FIGURA A1. Fijación de embriones de *Drosophila* en la ISS (microgravedad). A)** Protocolo para la fijación de embriones en ausencia de gravedad y sin fijadores de tipo aldehído. Este protocolo sólo requiere media hora para completar la fase que se realiza en microgravedad (hasta el  $\Delta t$ ), pero requiere de una post-fijación definitiva en tierra para que se puedan obtener detecciones inmunocitoquímicas. **B)** Detección inmunocitoquímica del sistema nervioso y el sistema muscular del embrión de *Drosophila* fijados con paraformaldehído o con Neofix. La fila inferior muestra un detalle de la detección por ELAV y  $\alpha$ -TpnT utilizando el método de Neofix tras 4 meses a 4°C. Aunque los resultados no son óptimos es posible rescatar la expresión en embriones fijados con Neofix. **C)** Microscopía en contraste de fase de cortes semifinos de *Drosophila* fijados con los dos métodos. Aunque inicialmente parece que ambos métodos son similares, los resultados de microscopía electrónica han revelado que el método basado en Neofix no es adecuado para estudios ultraestructurales.



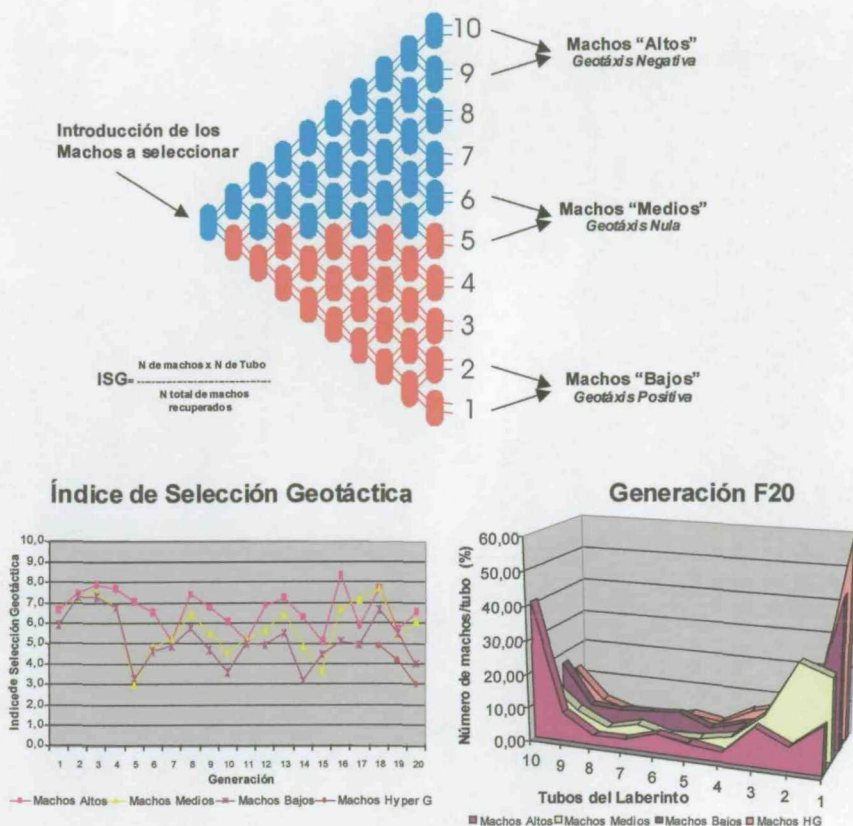
### Vuelo "TAXI" Misión Cervantes. Experimento AGE.

Durante el año 2003 nuestro laboratorio tuvo la oportunidad de participar en un vuelo "Taxi" (en una nave Soyuz con el objetivo de renovar la nave de emergencia y la tripulación de la ISS) con la participación del astronauta español Pedro Duque, y con una duración de 10 días (18 a 28 de Octubre). Debido en parte al accidente del transbordador Columbia a principios de este año, la Estación Espacial aún no está preparada para recibir experimentos complejos, por lo que nuestros experimentos debían ser autónomos.

El objetivo del experimento AGE es evaluar que efectos tiene la microgravedad en la longevidad de *Drosophila*. Anteriores experimentos de nuestro laboratorio (Benguría y otros, 1996, Marco y otros, 1996) detectaron un descenso en la longevidad de *Drosophila* en microgravedad acoplado a un aumento en la motilidad de las moscas. *Drosophila melanogaster* tiene un comportamiento geotáctico negativo (tiende a escapar del vector gravitatorio) y fototáctico positivo (busca la luz). Considerando que el aumento de la motilidad en microgravedad podría estar debido a la búsqueda del vector gravitatorio decidimos seleccionar tres cepas de *Drosophila* con diferente respuesta geotáctica. Además disponíamos en el laboratorio de unas cepas seleccionadas para que tengan una longevidad larga (LL de long life) o una baja longevidad (SL de short life).

La selección geotáctica se realizó en un laberinto de selección con 10 salidas colocado en posición vertical y en oscuridad (para evitar interferencias por la respuesta fototáctica, ver figura A2) siguiendo los trabajos clásicos de Dobzhansky (Dobzhansky, Spassky y Sved, 1966, 1969, Dobzhansky, Levene y Spassky, 1972). A partir de 250 machos se comenzaron a seleccionar los individuos "Altos" (Tubo 10, máximo desnivel positivo), "Medios" (Tubos 5+6, sin desnivel) y "Bajos" (Tubo 1, máximo desnivel negativo). Los individuos seleccionados se cruzaban con hembras vírgenes y con su progenie se repetía el experimento independientemente durante 20 generaciones. Los resultados expresados como media ponderada del número de machos recogidos en cada tubo multiplicados por el número del tubo (del 1 al 10, Índice de Selección Gravitáctica) muestran como se ha ido produciendo la selección en cada cepa seleccionada (valores altos indican geotaxis negativa (escape gravitatorio) y valores bajos geotaxis positiva, ver Figura A2). Aunque hemos observado una variabilidad muy alta entre cada generación, se observa una selección geotáctica en nuestras líneas si atendemos al porcentaje de machos que aparecen en los tubos esperados.





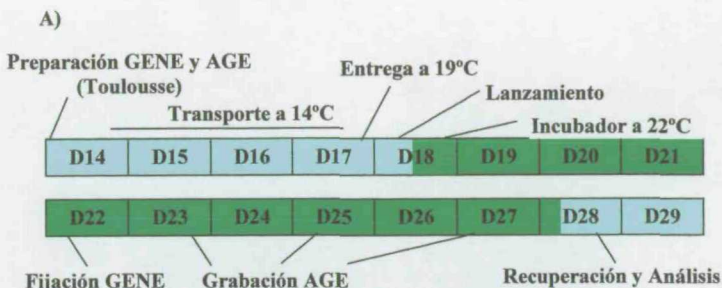
**FIGURA A2. Selección de cepas de *Drosophila* con respuesta gravitáctica alterada.** Arriba se muestra un esquema del laberinto de selección utilizado para seleccionar a *Drosophila* por su respuesta gravitáctica. En las gráficas se muestra la evolución del Índice de Selección Geotáctica (ver fórmula) durante 20 generaciones de selección. Aunque hay una gran variación entre generaciones (quizás debido a las condiciones no controladas del laberinto), en la segunda gráfica se muestra la distribución de las moscas introducidas en la generación F20, observándose como la mayoría de las moscas están respondiendo a la selección.

También disponíamos de una línea previamente seleccionada por Hirsch, con respuesta geotáctica positiva, HG "Hyper response to Gravity", (Stoltenberg, Hirsch y Berlocher, 1995). Esta respuesta fue corroborada durante tres generaciones en el laberinto de selección, y aunque ofrece unos valores de ISG mejores que la línea "Bajos" seleccionada por nosotros, su perfil de distribución es bastante similar en la generación F20 (Figura A2).

El experimento se realizó con unos miniaquarios cedidos por el Prof. Horn (Univ. de Ulm, Alemania, figura A3) con 50 machos en cada uno y una cantidad de alimento suficiente para que los machos se mantuvieran durante 15 días (puesta en marcha y diez días en microgravedad). Se utilizaron las líneas LL, SL (jóvenes), SL (maduras, con 15 días) y las líneas de respuesta a la gravedad alterada HG y "Bajas". Los resultados están pendientes de ser analizados en este momento, y se va a estudiar el comportamiento de las moscas (grabación con cámara de vídeo), su respuesta gravitáctica y de envejecimiento (medida por el número de moscas capaces de subir 25 cm en una probeta en 30'' y por su capacidad de apareamiento). A nivel molecular se están conservado las muestras en acetona para detectar los efectos del envejecimiento en los RNA ribosómicos. Este experimento nos ha permitido establecer una colaboración con el Dr. Horn, por lo que esperamos obtener información adicional sobre el comportamiento de las moscas y el estado de su sistema nervioso.

### **Vuelo "TAXI" Misión Cervantes. Experimento GENE.**

Dentro de la misión Cervantes nuestro laboratorio ha incluido otro experimento. El experimento GENE pretende analizar los posibles cambios en la expresión génica de *Drosophila* cuando su metamorfosis se realiza en microgravedad. Para ello se utilizó el montaje ilustrado en la figura A3. Larvas que están en el proceso de pupación son recogidas y posicionadas en papel IMM (20 pupas por papel). Tras unos minutos la mucosa del pupario adhiere las pupas al papel y este puede ser introducido dentro dos barreras de contención de plástico con unas ampollas que contienen acetona selladas bajo presión (para facilitar la expulsión de la acetona cuando se rompan en microgravedad). Este montaje se denomina "berlingot" y fue desarrollado por el Dr. Gilbert Gasset (Univ. de Toulouse, Francia). Estos berlingots se introducen en un dispositivo automático con un pequeño motor que acciona unas levas que rompen las ampollas cuando se desee (denominado "mamba" (Dutch Space)).



**FIGURA A3. Montajes de los experimentos AGE y GENE.** A) Calendario de los experimentos Gene y Age en la misión Cervantes. Se muestra en verde el tiempo de permanencia en microgravedad. B) Preparación del experimento GENE. Se muestran los elementos necesarios para este experimento. C) Detalle del mecanismo de ampollas utilizado en los berlingots. D) Miniacuario cedido por E. Horn para el experimento AGE. Se muestran algunas moscas en su interior y se aprecia el alimento en los extremos.

Las pupas se mantuvieron cuatro días a 13°C para detener su desarrollo hasta el lanzamiento. Después se desarrollaron a RT durante 3 días en microgravedad y entonces se activó la rotura de las ampollas (por parte de Pedro Duque) y se conservaron las pupas desarrolladas a -20°C en acetona hasta que se recuperó el experimento en tierra. Una vez recuperado se extrajeron los RNAs y se conservaron en etanol. Pretendemos utilizar estos RNAs para detectar cambios en la expresión génica de *Drosophila*, debidos a la falta de gravedad, utilizando chips de ADN.

### Publicaciones Línea de Investigación “Troponinas”

Axeno a esta memoria también se ha incluido el artículo “Expression pattern characterization of the whole Troponin C gene repertoire during *Drosophila* development”, firmado por Herranz, R., C. Díaz-Castillo, T. G. Nguyen, T. L. Lovato, R. M. Cripps y R. Marco que será publicado en Diciembre de 2003 en Gene Expression Patterns (Nueva sección de Mechanism of Development). Mis contribuciones ha este trabajo han sido explícitamente comentadas en las secciones Resultados y Discusión.

Dos artículos más, relacionados con el contenido de esta memoria, están pendientes de publicación, el primero titulado “Evolutionary characterization of Troponin C genes in insects” firmado por Herranz, R., J. Mateos y R. Marco, enviado a Molecular Biology and Evolution, contiene la información evolutiva incluida en esta memoria relativa a los genes de la Troponina C. El segundo artículo titulado “Concerted Evolution of tissue-specific Troponin isoforms in insects” firmado por Herranz, R., J. A. Mas, E. Garcia-Zaragoza, J. Mateos, M. Cervera y R. Marco está actualmente en preparación, y contendrá los análisis correspondientes a los genes Troponina T y Troponina I que se han presentado en esta memoria, más la información que se pueda generar cuando estén disponibles las secuencias genómicas completas de la TpnT y la TpnI para *Apis mellifera*, tanto a nivel de comparación de secuencias como de estudios de expresión génica. Los estudios de expresión de los exones variables en las regiones carboxilo terminal de ambas Troponinas ya se han iniciado.



**BIBLIOGRAFÍA**

- Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt y otros 2000. *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science. **287** (5461):2185-95
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson. 1996. *Biología molecular de la célula*. Tercera Edición. Ediciones Omega, Barcelona
- Allhouse, L. D., G. Guzman, T. Miller, Q. Li, J. D. Potter y C. C. Ashley. 1999. *Characterisation of a mutant of barnacle troponin C lacking Ca<sup>2+</sup>-binding sites at positions II and IV*. Pflugers Arch. **438** (1):30-9
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D. J. Lipman. 1997. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res. **25** (17):3389-402
- Arredondo, J. J., R. M. Ferreres, M. Maroto, R. M. Cripps, R. Marco, S. I. Bernstein y M. Cervera. 2001. *Control of Drosophila paramyosin/miniparamyosin gene expression. Differential regulatory mechanisms for muscle-specific transcription*. J Biol Chem. **276** (11):8278-87
- Baldauf, S. L. 2003a. *The deep roots of eukaryotes*. Science. **300** (5626):1703-6
- Baldauf, S. L. 2003b. *Phylogeny for the faint of heart: a tutorial*. Trends Genet. **19** (6):345-51
- Barbas, J. A., J. Galceran, I. Krah-Jentgens, J. L. de la Pompa, I. Canal, O. Pongs y A. Ferrus. 1991. *Troponin I is encoded in the haplolethal region of the Shaker gene complex of Drosophila*. Genes Dev. **5** (1):132-40
- Barbas, J. A., J. Galceran, L. Torroja, A. Prado y A. Ferrus. 1993. *Abnormal muscle development in the heldup3 mutant of Drosophila melanogaster is caused by a splicing defect affecting selected troponin I isoforms*. Mol Cell Biol. **13** (3):1433-9
- Barton, P. J., M. E. Cullen, P. J. Townsend, N. J. Brand, A. J. Mullen, D. A. Norman, P. K. Bhavsar y M. H. Yacoub. 1999. *Close physical linkage of human troponin genes: organization, sequence, and expression of the locus encoding cardiac troponin I and slow skeletal troponin T*. Genomics. **57** (1):102-9
- Bate, M. y A. Martínez-Arias. 1993. *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Benguría, A., E. Grande, E. de Juan, C. Ugalde, J. Miquel, R. Garesse y R. Marco. 1996. *Microgravity effects on Drosophila melanogaster behavior and aging. Implications of the IML-2 experiment*. J Biotechnol. **47** (2-3):191-201

- Benoist, P., J. A. Mas, R. Marco y M. Cervera. 1998. *Differential muscle-type expression of the Drosophila troponin T gene. A 3-base pair microexon is involved in visceral and adult hypodermic muscle specification.* J Biol Chem. **273** (13):7538-46
- Bullard, B., K. Leonard, A. Larkins, G. Butcher, C. Karlik y E. Fyrberg. 1988. *Troponin of asynchronous flight muscle.* J Mol Biol. **204** (3):621-37
- Celniker, S. E., D. A. Wheeler, B. Kronmiller y otros 2002. *Finishing a whole-genome shotgun: Release 3 of the Drosophila melanogaster euchromatic genome sequence.* Genome Biol. **3** (12):RESEARCH0079-9
- Clark, A. G., B. G. Leicht y S. V. Muse. 1996. *Length variation and secondary structure of introns in the Mlc1 gene in six species of Drosophila.* Mol Biol Evol. **13** (3):471-82
- Clark, K. A., A. S. McElhinny, M. C. Beckerle y C. C. Gregorio. 2002. *Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function.* Annu Rev Cell Dev Biol. **18** 637-706
- Cohen, C. y K. C. Holmes. 1963. *X-ray diffraction evidence for alpha-helical coiled-coils in native muscle.* J Mol Biol. **6** 423-32
- Craig, R. y W. Lehman. 2001. *Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments.* J Mol Biol. **311** (5):1027-36
- Darwin, C. 1859. *On the origin of Species by means of Natural Selection.* John Murray, London
- Demerec, M. 1950. *Biology of Drosophila.* John Wiley & Sons, Inc., New York
- Dobzhansky, T., H. Levene y B. Spassky. 1972. *Effects of selection and migration on geotactic and phototactic behaviour of Drosophila. 3.* Proc R Soc Lond B Biol Sci. **180** (58):21-41
- Dobzhansky, T., B. Spassky y J. Sved. 1966. *Effects of selection and migration on geotactic and phototactic behaviour of Drosophila. I.* Proc R Soc Lond B Biol Sci. **168** (7):27-47
- Dobzhansky, T., B. Spassky y J. Sved. 1969. *Effects of selection and migration on geotactic and phototactic behaviour of Drosophila. II.* Proc R Soc Lond B Biol Sci. **173** (31):191-207

- Domingo, A., J. Gonzalez-Jurado, M. Maroto, C. Diaz, J. Vinos, C. Carrasco, M. Cervera y R. Marco. 1998. *Troponin-T is a calcium-binding protein in insect muscle: in vivo phosphorylation, muscle-specific isoforms and developmental profile in Drosophila melanogaster*. J Muscle Res Cell Motil. **19** (4):393-403
- Dudley, R. 2000. *The Biomechanics of Insect Flight: Form, Function, Evolution*. Princeton University Press.,
- Epstein, H. F., D. M. Miller, 3rd, I. Ortiz y G. C. Berliner. 1985. *Myosin and paramyosin are organized about a newly identified core structure*. J Cell Biol. **100** (3):904-15
- Fernandes, J., M. Bate y K. Vijayraghavan. 1991. *Development of the indirect flight muscles of Drosophila*. Development. **113** (1):67-77
- Filatov, V. L., A. G. Katrukha, T. V. Bulargina y N. B. Gusev. 1999. *Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning*. Biochemistry (Mosc). **64** (9):969-85
- Force, A., M. Lynch, F. B. Pickett, A. Amores, Y. L. Yan y J. Postlethwait. 1999. *Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations*. Genetics. **151** (4):1531-45
- Fyrberg, C., H. Parker, B. Hutchison y E. Fyrberg. 1994. *Drosophila melanogaster genes encoding three troponin-C isoforms and a calmodulin-related protein*. Biochem Genet. **32** (3-4):119-35
- Gordon, A. M., E. Homsher y M. Regnier. 2000. *Regulation of contraction in striated muscle*. Physiol Rev. **80** (2):853-924
- Gordon, A. M., M. Regnier y E. Homsher. 2001. *Skeletal and cardiac muscle contractile activation: tropomyosin "rocks and rolls"*. News Physiol Sci. **16** 49-55
- Grabarek, Z., T. Tao y J. Gergely. 1992. *Molecular mechanism of troponin-C function*. J Muscle Res Cell Motil. **13** (4):383-93
- Guex, N. y M. C. Peitsch. 1997. *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis. **18** (15):2714-23
- Hall, T. A. 1999. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucl. Acids. Symp. Ser. **41** 95-98
- Herranz, R., C. Díaz-Castillo, T. G. Nguyen, T. L. Lovato, R. M. Cripps y R. Marco. 2003. *Expression pattern characterization of the whole Troponin C gene repertoire during Drosophila development*. Mech Dev. (GEP) En prensa.

- Herranz, R., D. Husson, M. Pastor, C. Diaz, J. Mateos, A. Villa, F. J. Medina y R. Marco. 2002. *Towards the establishment of a permanent colony of Drosophila in the international space station: Hardware and adaptation of techniques*. J Gravit Physiol. **9** (1):357-58
- Herranz, R., J. Mateos y R. Marco. Enviado. *Evolutionary characterization of insects TpnC genes*. Mol. Bio. Evol.
- Holt, R. A., G. M. Subramanian, A. Halpern y otros 2002. *The genome sequence of the malaria mosquito Anopheles gambiae*. Science. **298** (5591):129-49
- Huang, Q. Q. y J. P. Jin. 1999. *Preserved close linkage between the genes encoding troponin I and troponin T, reflecting an evolution of adapter proteins coupling the Ca(2+) signaling of contractility*. J Mol Evol. **49** (6):780-8
- Jones, D. T. 1999. *Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices*. J Mol Biol. **292** (2):195-202
- Josephson, R. K., J. G. Malamud y D. R. Stokes. 2000. *Asynchronous muscle: a primer*. J Exp Biol. **203 Pt 18** 2713-22
- Kawasaki, H., S. Nakayama y R. H. Kretsinger. 1998. *Classification and evolution of EF-hand proteins*. Biometals. **11** (4):277-95
- Kohler, R. E. 1994. *Lords of the Fly: Drosophila genetics and the experimental life*. The University of Chicago Press, Chicago and London
- Leavis, P. C. y J. Gergely. 1984. *Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction*. CRC Crit Rev Biochem. **16** (3):235-305
- Lehman, W. y A. G. Szent-Gyorgyi. 1975. *Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom*. J Gen Physiol. **66** (1):1-30
- Lovato, T. L., S. M. Meadows, P. W. Baker, J. C. Sparrow y R. M. Cripps. 2001. *Characterization of muscle actin genes in Drosophila virilis reveals significant molecular complexity in skeletal muscle types*. Insect Mol Biol. **10** (4):333-40
- Lynch, D. V., T. T. Lin, S. P. Myers, S. P. Leibo, R. J. Macintyre, R. E. Pitt y P. L. Steponkus. 1989. *A two-step method for permeabilization of Drosophila eggs*. Cryobiology. **26** (5):445-52
- Lynch, M. y J. S. Conery. 2000. *The evolutionary fate and consequences of duplicate genes*. Science. **290** (5494):1151-5



- Lynch, M. y A. Force. 2000. *The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization*. Genetics. **154** (1):459-73
- Marco, R., A. Benguria, J. Sanchez y E. de Juan. 1996. *Effects of the space environment on Drosophila melanogaster development. Implications of the IML-2 experiment*. J Biotechnol. **47** (2-3):179-89
- Marden, J. H., G. H. Fitzhugh, M. Girgenrath, M. R. Wolf y S. Girgenrath. 2001. *Alternative splicing, muscle contraction and intraspecific variation: associations between troponin T transcripts, Ca(2+) sensitivity and the force and power output of dragonfly flight muscles during oscillatory contraction*. J Exp Biol. **204** (Pt 20):3457-70
- Marden, J. H., G. H. Fitzhugh, M. R. Wolf, K. D. Arnold y B. Rowan. 1999. *Alternative splicing, muscle calcium sensitivity, and the modulation of dragonfly flight performance*. Proc Natl Acad Sci U S A. **96** (26):15304-9
- Marín, M.-C., J.-R. Rodríguez y A. Ferrús. En prensa. *Transcription of Drosophila Troponin I gene is regulated by two conserved, functionally identical, synergistic elements*. Mol Biol Cell.
- Maroto, M., J. J. Arredondo, M. San Roman, R. Marco y M. Cervera. 1995. *Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. Miniparamyosin is an independently transcribed, distinct paramyosin isoform, widely distributed in invertebrates*. J Biol Chem. **270** (9):4375-82
- Marsden, B. J., G. S. Shaw y B. D. Sykes. 1990. *Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments*. Biochem Cell Biol. **68** (3):587-601
- Mas, J. A., E. García-Zaragoza y M. Cervera. En prensa. *Two functionally identical modular enhancers in Drosophila Troponin T gene establish the correct protein levels in different muscle types*. Mol Biol Cell.
- Mateos, J., R. Herranz, A. Domingo, J. C. Sparrow y R. Marco. Enviado. *Troponin H or Tropomyosin H in Drosophila? Phosphorylation state and structural role of the IFMs specific Tm1 products gene in Dipterans flight muscle*.
- McGuffin, L. J., K. Bryson y D. T. Jones. 2000. *The PSIPRED protein structure prediction server*. Bioinformatics. **16** (4):404-5

- Nakayama, S. y R. H. Kretsinger. 1993. *Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. III. Exon sequences confirm most dendrograms based on protein sequences: calmodulin dendrograms show significant lack of parallelism.* J Mol Evol. **36** (5):458-76
- Nakayama, S. y R. H. Kretsinger. 1994. *Evolution of the EF-hand family of proteins.* Annu Rev Biophys Biomol Struct. **23** 473-507
- Nakayama, S., N. D. Moncrief y R. H. Kretsinger. 1992. *Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. II. Domains of several subfamilies have diverse evolutionary histories.* J Mol Evol. **34** (5):416-48
- Ojima, T., N. Koizumi, K. Ueyama, A. Inoue y K. Nishita. 2000. *Functional role of Ca(2+)-binding site IV of scallop troponin C.* J Biochem (Tokyo). **128** (5):803-9
- O'Neill, J. W. y E. Bier. 1994. *Double-label in situ hybridization using biotin and digoxigenin-tagged RNA probes.* Biotechniques. **17** (5):870, 74-5
- Oota, S. y N. Saitou. 1999. *Phylogenetic relationship of muscle tissues deduced from superimposition of gene trees.* Mol Biol Evol. **16** (6):856-67
- Page, R. D. 1996. *TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers.* Comput Appl Biosci. **12** (4):357-8
- Peckham, M., R. M. Cripps, D. White y B. Bullard. 1992. *Mechanics and protein content of insect flight muscles.* J. Exp. Biol. **168** 57-76
- Potter, J. D., Z. Sheng, B. S. Pan y J. Zhao. 1995. *A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca<sup>2+</sup> regulation of muscle contraction.* J Biol Chem. **270** (6):2557-62
- Powell, J. R. 1997. *Progress and prospects in Evolutionary Genetics: The Drosophila Model.* New York Oxford University press, NY
- Pringle, J. W. 1981. *The evolution of fibrillar muscle in insects.* J. Exp. Biol. **94** 1-14
- Qiu, F., A. Lakey, B. Agianian, A. Hutchings, G. W. Butcher, S. Labeit, K. Leonard y B. Bullard. 2003. *Troponin C in different insect muscle types: identification of two isoforms in Lethocerus, Drosophila and Anopheles that are specific to asynchronous flight muscle in the adult insect.* Biochem J. **371** (Pt 3):811-21
- Quandt, K., K. Frech, H. Karas, E. Wingender y T. Werner. 1995. *MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data.* Nucleic Acids Res. **23** (23):4878-84

- Reinach, F. C., C. S. Farah, P. B. Monteiro y B. Malnic. 1997. *Structural interactions responsible for the assembly of the troponin complex on the muscle thin filament*. Cell Struct Funct. **22** (1):219-23
- Rokas, A. y P. W. Holland. 2000. *Rare genomic changes as a tool for phylogenetics*. Trends in Ecology and Evolution. **15** (11):454-59
- Ruiz Gomez, M. y M. Bate. 1997. *Segregation of myogenic lineages in Drosophila requires numb*. Development. **124** (23):4857-66
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sanderson, M. J. y H. B. Shaffer. 2002. *Troubleshooting Molecular Phylogenetic Analyses*. Annu. Rev. Ecol. Syst. **33** 49-72
- Schaertl, S., S. S. Lehrer y M. A. Geeves. 1995. *Separation and characterization of the two functional regions of troponin involved in muscle thin filament regulation*. Biochemistry. **34** (49):15890-4
- Schiaffino, S. y C. Reggiani. 1996. *Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance*. Physiol Rev. **76** (2):371-423
- Schwede, T., A. Diemand, N. Guex y M. C. Peitsch. 2000. *Protein structure computing in the genomic era*. Res Microbiol. **151** (2):107-12
- Sharakhov, I. V., A. C. Serazin, O. G. Grushko y otros 2002. *Inversions and gene order shuffling in Anopheles gambiae and A. funestus*. Science. **298** (5591):182-5
- da Silva, A. C., J. Kendrick-Jones y F. C. Reinach. 1995. *Determinants of ion specificity on EF-hands sites. Conversion of the Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> site of smooth muscle myosin regulatory light chain into a Ca(2+)-specific site*. J Biol Chem. **270** (12):6773-8
- Sorenson, M. D., K. M. Sefc y R. B. Payne. 2003. *Speciation by host switch in brood parasitic indigobirds*. Nature. **424** (6951):928-31
- Sparrow, J. C. 1995. *Muscle. Flight and phosphorylation*. Nature. **374** (6523):592-3
- Spradling, A. C. y G. M. Rubin. 1982. *Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes*. Science. **218** (4570):341-7
- Stoltenberg, S. F., J. Hirsch y S. H. Berlocher. 1995. *Analyzing correlations of three types in selected lines of Drosophila melanogaster that have evolved stable extreme geotactic performance*. J Comp Psychol. **109** (1):85-94
- Takeda, S., A. Yamashita, K. Maeda y Y. Maeda. 2003. *Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form*. Nature. **424** (6944):35-41

- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res. **22** (22):4673-80
- Toumanoff, C. 1951. *Les maladies des abeilles*. La revue française d'apiculture. **68** (29-33):
- Ueda, T., H. Katsuzaki, H. Terami, H. Ohtsuka, H. Kagawa, T. Murase, Y. Kajiwarra, O. Yoshioka y T. Iio. 2001. *Calcium-bindings of wild type and mutant troponin Cs of Caenorhabditis elegans*. Biochim Biophys Acta. **1548** (2):220-8
- Varios autores. 1998. *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. The C. elegans Sequencing Consortium. Science. **282** (5396):2012-8
- Varios autores. 2003. *Special Report: Tree of life*. Nature. **300** (5626):1692-709
- Venkatesh, B., M. V. Erdmann y S. Brenner. 2001. *Molecular synapomorphies resolve evolutionary relationships of extant jawed vertebrates*. Proc Natl Acad Sci U S A. **98** (20):11382-7
- Vigoreaux, J. O. 2001. *Genetics of the Drosophila flight muscle myofibril: a window into the biology of complex systems*. Bioessays. **23** (11):1047-63
- Vinos, J., A. Domingo, R. Marco y M. Cervera. 1991. *Identification and characterization of Drosophila melanogaster paramyosin*. J Mol Biol. **220** (3):687-700
- Wendt, T., V. Guenebaut y K. R. Leonard. 1997. *Structure of the Lethocerus troponin-tropomyosin complex as determined by electron microscopy*. J Struct Biol. **118** (1):1-8
- Wendt, T. y K. Leonard. 1999. *Structure of the insect troponin complex*. J Mol Biol. **285** (4):1845-56
- White, D. C. 1983. *The elasticity of relaxed insect fibrillar flight muscle*. J Physiol. **343** 31-57
- Wingender, E., X. Chen, R. Hehl y otros 2000. *TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation*. Nucleic Acids Res. **28** (1):316-9
- You, M., X. Xuan, N. Tsuji, T. Kamio, I. Igarashi, H. Nagasawa, T. Mikami y K. Fujisaki. 2001. *Molecular characterization of a troponin I-like protein from the hard tick Haemaphysalis longicornis*. Insect Biochem Mol Biol. **32** (1):67-73



- Yuasa, H. J., J. A. Cox y T. Takagi. 1998. *Diversity of the troponin C genes during chordate evolution*. J Biochem (Tokyo). **123** (6):1180-90
- Yuasa, H. J. y T. Takagi. 2000. *The genomic structure of the scallop, Patinopecten yessoensis, troponin C gene: a hypothesis for the evolution of troponin C*. Gene. **245** (2):275-81
- Yuasa, H. J. y T. Takagi. 2001. *Genomic structure of the sandworm, Perinereis vancaurica tetradentata, troponin C*. Gene. **268** (1-2):17-22
- Zdobnov, E. M., C. von Mering, I. Letunic y otros 2002. *Comparative genome<sup>\*</sup> and proteome analysis of Anopheles gambiae and Drosophila melanogaster*. Science. **298** (5591):149-59
- Zhao, J., L. Hyman y C. Moore. 1999. *Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis*. Microbiol Mol Biol Rev. **63** (2):405-45



## TOWARDS THE ESTABLISHMENT OF A PERMANENT COLONY OF *Drosophila* IN THE INTERNATIONAL SPACE STATION: Hardware Tests and Adaptation of Techniques

R. Herranz<sup>(1)</sup>, D. Husson<sup>(1)</sup>, M. Pastor<sup>(2)</sup>, C. Diaz<sup>(1)</sup>, J. Mateos<sup>(1)</sup>, A. Villa<sup>(1)</sup>, F.J. Medina<sup>(3)</sup> & R. Marco<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Dept. de Bioquímica & Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", UAM-CSIC, Madrid 28029, Spain

<sup>(2)</sup>NTE, Barcelona 08186, Spain. <sup>(3)</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC, Madrid 28006, Spain

### ABSTRACT

Our group has the long-term goal of establishing a permanent colony of *Drosophila melanogaster* in the International Space Station (ISS) to study its long-term adaptation to this unusual environment. We are currently building an enhanced version of an automatic cultivation unit (ESE1) in which we can grow flies with minimal crew involvement. We are working on a fixation unit as well. We are also adapting current protocols to maintain fixed animals during at least three months, the minimal refurbishment shuttle flight time, with minimal handling and maximal automatization, that can be used for immunocytochemistry, ultrastructure or molecular experiments.

### 1. INTRODUCTION

In previous work, we have identified a behavioral response experienced by the flies exposed to Microgravity, namely, an increase in motility that may be related to the negative geotactic escape response of *Drosophila* [3]. In young males it has the consequence of accelerating the aging response [1], and we intend now to study this phenomenon in long-term exposures to microgravity. One of the problems in the utilization of the ISS, especially in the present version, is the limitation in many scientific requirements, among them, energy, room and crew-time availability. Thus, we have been developing automatic instrumentation to carry out meaningful biological experiments in Space with small Invertebrates. It has to be pointed out that sample exchange and equipment refurbishment will take place every three months, when a Shuttle Flight will be expected to visit the Space Station. This is the time frame that we have to comply with. We are adapting current protocols to maintain fixed flies and embryos during at least three months.

### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1 Hardware design and test

Fig.1 shows the main components of the ESE-1 cultivation system. There are two chambers and a drum with 6 food trays. Groups of flies, 50 per container (40 females and 10 males) can be handed-over in one of these Units. The chambers are separated by doors from the food trays. Each food tray can be positioned automatically in front of a chamber and the doors can be opened on command. Additionally, the activity of the adults in the chambers can be monitored by IR beams and video recordings. Food trays can be subjected to a heat treatment to kill embryos or larvae by keeping them 30 minutes at 50°C, or they can be transferred into specific embryo units for observation or fixation. One of the trays collections should be transferred into the second chamber of the ESE1 unit to allow for the development of a new generation of flies, which will allow the initiation of a

new round of experiments. The drum is exchanged every two weeks refurbished with a set of fresh feeding trays, allowing the unit to be ready for a new generation of flies.

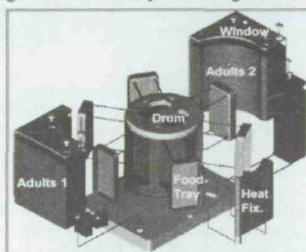


Fig.1 Scheme of ESE-1 Unit

A new unit is been designed to collect, observe and fix embryos grown to the expected developmental stage, and soon will be in production phase. It is based on a simple fluid injection method that allows to add or remove different solutions. A current prototype allows the removal of embryos from culture trays and transfer them into another observation chamber which can be mounted in the on-board phase-contrast and fluorescence microscope (we plan to monitor embryos expressing GFP-tagged components along all their development).

#### 2.2 Permeabilisation/Fixation Protocols.

We have been developing a permeabilisation-fixation protocol able to preserve embryos during at least three months. Classic protocols based on formaldehyde-heptane, cannot be easily adapted to be used in microgravity, and the Steponkus-Cadwell protocol [2] although able to return a good DAPI signal, is less than optimal for immunocytochemistry.

Our more successful protocol uses a commercial non-formaline fixative, NEOFIX®, just after two steps with Isopropanol and Hexane (permeabilization reagent). After this step the embryos can be stored in methanol at 4°C and after the sample recovery the procedure can be successfully completed with a post fixation step with Heptan/PBS or Heptan/Metanol. This protocol combines the first part of the Steponkus-Cadwell protocol and the last part of the Heptan classic protocol, but without para-formaldehyde (PFA).

#### 2.3 Immunocytochemistry

We used three antibodies, ELAV, anti-tropomyosin( $\alpha$ -Tm-144) and anti-troponinT( $\alpha$ -TnT generated in our group), and a second peroxidase-coupled antibody for immunodetection using DAB (diaminobenzidine) and  $H_2O_2$ .

## TOWARDS THE ESTABLISHMENT OF A PERMANENT COLONY OF *Drosophila* IN THE INTERNATIONAL SPACE STATION: Hardware Tests and Adaptation of Techniques

R. Herranz<sup>(1)</sup>, D. Husson<sup>(1)</sup>, M. Pastor<sup>(2)</sup>, C. Diaz<sup>(1)</sup>, J. Mateos<sup>(1)</sup>, A. Villa<sup>(1)</sup>, F.J. Medina<sup>(3)</sup> & R. Marco<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Dept. de Bioquímica & Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", UAM-CSIC, Madrid 28029, Spain

<sup>(2)</sup>NTE, Barcelona 08186, Spain. <sup>(3)</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC, Madrid 28006, Spain

### ABSTRACT

Our group has the long-term goal of establishing a permanent colony of *Drosophila melanogaster* in the International Space Station (ISS) to study its long-term adaptation to this unusual environment. We are currently building an enhanced version of an automatic cultivation unit (ESE1) in which we can grow flies with minimal crew involvement. We are working on a fixation unit as well. We are also adapting current protocols to maintain fixed animals during at least three months, the minimal refurbishment shuttle flight time, with minimal handling and maximal automatization, that can be used for immunocytochemistry, ultrastructure or molecular experiments.

### 1. INTRODUCTION

In previous work, we have identified a behavioral response experienced by the flies exposed to Microgravity, namely, an increase in motility that may be related to the negative geotactic escape response of *Drosophila* [3]. In young males it has the consequence of accelerating the aging response [1], and we intend now to study this phenomenon in long-term exposures to microgravity. One of the problems in the utilization of the ISS, especially in the present version, is the limitation in many scientific requirements, among them, energy, room and crew-time availability. Thus, we have been developing automatic instrumentation to carry out meaningful biological experiments in Space with small Invertebrates. It has to be pointed out that sample exchange and equipment refurbishment will take place every three months, when a Shuttle Flight will be expected to visit the Space Station. This is the time frame that we have to comply with. We are adapting current protocols to maintain fixed flies and embryos during at least three months.

### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1 Hardware design and test

Fig.1 shows the main components of the ESE-1 cultivation system. There are two chambers and a drum with 6 food trays. Groups of flies, 50 per container (40 females and 10 males) can be handed-over in one of these Units. The chambers are separated by doors from the food trays. Each food tray can be positioned automatically in front of a chamber and the doors can be opened on command. Additionally, the activity of the adults in the chambers can be monitored by IR beams and video recordings. Food trays can be subjected to a heat treatment to kill embryos or larvae by keeping them 30 minutes at 50°C, or they can be transferred into specific embryo units for observation or fixation. One of the trays collections should be transferred into the second chamber of the ESE1 unit to allow for the development of a new generation of flies, which will allow the initiation of a

new round of experiments. The drum is exchanged every two weeks refurbished with a set of fresh feeding trays, allowing the unit to be ready for a new generation of flies.

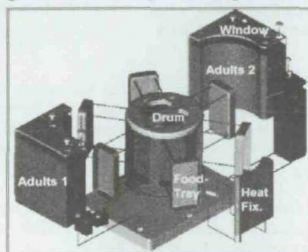


Fig.1 Scheme of ESE-1 Unit

A new unit is been designed to collect, observe and fix embryos grown to the expected developmental stage, and soon will be in production phase. It is based on a simple fluid injection method that allows to add or remove different solutions. A current prototype allows the removal of embryos from culture trays and transfer them into another observation chamber which can be mounted in the on-board phase-contrast and fluorescence microscope (we plan to monitor embryos expressing GFP-tagged components along all their development).

#### 2.2 Permeabilisation/Fixation Protocols.

We have been developing a permeabilisation-fixation protocol able to preserve embryos during at least three months. Classic protocols based on formaldehyde-heptane, cannot be easily adapted to be used in microgravity, and the Steponkus-Cadwell protocol [2] although able to return a good DAPI signal, is less than optimal for immunocytochemistry.

Our more successful protocol uses a commercial non-formaline fixative, NEOFIX®, just after two steps with Isopropanol and Hexane (permeabilization reagent). After this step the embryos can be stored in methanol at 4°C and after the sample recovery the procedure can be successfully completed with a post fixation step with Heptan/PBS and Heptan/Methanol. This protocol combines the first part of the Steponkus-Cadwell protocol and the last part of the Heptan classic protocol, but without para-formaldehyde (PFA).

#### 2.3 Immunocytochemistry

We used three antibodies, ELAV, anti-tropomyosin( $\alpha$ -Tm-144) and anti-troponinT( $\alpha$ -TnT generated in our group), and a second peroxidase-coupled antibody for immunodetection using DAB (diaminobenzidine) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



## 2.4 Phase-contrast microscopy

After post-flight fixation embryos are progressively rehydrated and treated with LR White Resin[4]. Embryos are stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $2\mu\text{m}$  sections are obtained.

## 2.5 RNA extraction and RT-PCRs

RNA was extracted from samples (conserved in dehydrated acetone solution at different temperatures) using a TRIZOL<sup>®</sup> commercial protocol and RT-PCRs were performed with several muscular gene probes and normalized RNA amount ( $2\mu\text{g}$ ) with a  $55^{\circ}\text{C}$  hybridization temperature in 35 PCR cycles.

## 3. RESULTS

In the current prototype of cultivation unit we can successfully grow several generations of *Drosophila*, but several technical problems still remain to be solved in an upgraded ESE-I unit. We have been testing a Collecting Unit prototype with success and an upgraded fixation unit will become available soon.

Using PFA as fixative the methanol conservation of embryos can be extended more than 5 months without much loss of details. NEOFIX<sup>®</sup> Protocol can be used in the ISS, and the ELAV antibody can detect the Central Nervous System at least after 16 weeks of conservation in methanol (see fig.2A), but at  $4^{\circ}\text{C}$ . Room Temperature causes a significant loss of signal. Just in the same way we used anti-TM & anti-TnT antibodies for detection of the Muscular system in *Drosophila* embryos conserved in methanol for ten weeks at  $4^{\circ}\text{C}$ . In the case of TM the immunosignal is weak using either PFA or NEOFIX<sup>®</sup> in fixation. In the case of TnT antibody, the immuno signal is more or less the same in the three experimental conditions (data not shown). Thus, the success of long term-delayed immunocytochemistry is very much antibody dependent.

The NEOFIX<sup>®</sup> protocol used to return us a weaker and more diffuse immunosignal than PFA fixation. These results suggested a less than optimal level of morphological preservation. We used the same embryo fixation protocols followed by rehydration and LR White Resin inclusion after 3,5 months in methanol. In fig.2B we can see a NEOFIX<sup>®</sup> fixed embryo in phase-contrast microscopy ( $2\mu\text{m}$  section). The embryo morphology is well preserved no matter the protocol used.

Apart from cytological experiments we intend to extend our studies to Molecular Biology. In samples stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $4^{\circ}\text{C}$  conservation of rRNA is almost perfect during at least one month (data not shown). In fig.2C we show that rRNA is preserved after seven months in acetone at  $4^{\circ}\text{C}$  or even at room temperature (amount reduced 2 fold compared to control). In RT-PCR experiments all expected bands appear revealing the isoforms pattern for the embryos and for adults.

## 4. DISCUSSION

Obviously more work has to be carried out before we are prepared to start our project of maintaining a permanent *Drosophila* colony in the ISS. The Culture Unit ESE-I is being upgraded. An embryo collecting and

observation Unit is in advanced design step. Different concepts are being suggested by the members of the ESA Topical Team on Sample Fixation and Preservation for the design of the Fixation and Permeabilization Units.

Immunocytochemical protocols have been optimized with different monoclonal or polyclonal antibodies, and now we are working mainly on Proteins and RNA techniques. We intend also to extend this study to several muscular genes involved in contraction regulation, like the thin filament proteins Tropomyosin and Troponin components (TnC, TnI & TnT), because our previously published data indicate differential muscular activity in microgravity conditions. We are expecting electron microscopy results to confirm our idea of the acceptability of the ultrastructural embryo preservation suggested by our semi-thin slides in contrast-phase microscopy.

We expect that the establishment of a permanent colony of *Drosophila* in ISS will return valuable information on how an organism adapts its behaviour and phenotypic properties, including its molecular and cellular activities to long-term exposures to microgravity. The partner company, NTE, is willing to provide support to researchers interested in proposing experiments in the ISS that may find attractive the possibility of using/adapting to their research objectives the developed equipment and/or know-how.

**ACKNOWLEDGMENTS**-We thank to ESA & UAM for support of this presentation and to J.A. Más & E. García-Zaragoza for their collaboration in TnT-related experiments.

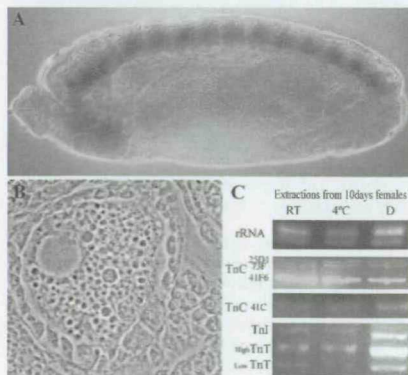


Fig.2. Different NEOFIX fixation results.

A-Immunocytochemistry with ELAV antibody

B-Phase-Contrast embryo microscopy

C-RNA extractions & RT-PCR for Troponin cDNAs

## 5. REFERENCES

1. Benguria et al., *J. Biotech.*, 1996, 47:191-201.
2. Lynch et al., *Cryobiology*, 1989, 26(5):445-52
3. Marco et al., *J. Biotech.*, 1996, 47: 179-190.
4. Newman, G.R., *Histochem. J.*, 1987 19:118.



## Expression patterns of the whole Troponin C gene repertoire during *Drosophila* development

Raul Herranz<sup>a,1</sup>, Carlos Díaz-Castillo<sup>a,1,2</sup>, Thiennga P. Nguyen<sup>b</sup>, TyAnna L. Lovato<sup>b</sup>, Richard M. Cripps<sup>b</sup>, Roberto Marco<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica de la UAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberio Sols'

Facultad de Medicina UAM-CSIC, C/Arzobispo Morcillo, 4 CP 28029 Madrid, Spain

<sup>b</sup>Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, NM 87131-1091, USA

Received 3 June 2003; received in revised form 3 September 2003; accepted 4 September 2003

### Abstract

The success of the genomic sequencing programs allows the discovery of additional family members of genes encoding known functions. This is the case of the Troponin C gene repertoire in *Drosophila melanogaster*. We have found two new Troponin C genes, DmTpnC41F and DmTpnC25D, increasing to five the total number of Troponin C genes identified in this species. The comparative characterization of the five Troponin C genes in *D. melanogaster* demonstrates considerable variation in gene structure and expression pattern. Expression of one gene, DmTpnC41F, has more restricted tissue specificity than the rest of the TpnC genes and, with the chromosomally linked DmTpnC41C, is expressed specifically in the adult thorax. The new gene, DmTpnC25D is expressed during development more broadly than the rest. In adults, it is highly expressed in the adult head. Finally, the other two genes, DmTpnC47D and DmTpnC73F, show a high embryonic/larval expression and in adults are expressed almost exclusively in the abdomens. The functional adaptive changes that may have evolved during the expansion of this gene family are briefly discussed in terms of the expression patterns, gene and protein structures leading to a simpler, more systematic nomenclature of the gene family.

© 2003 Published by Elsevier Ireland Ltd.

**Keywords:** Troponin complex gene families; New Troponin C genes; Intron–exon organization; RACE analyses; Transcription initiation; Expression patterns; Subfunctionalization; *Drosophila melanogaster* larval and adult muscles; IFM TDT RT-PCR Northern in situ hybridization; Ca binding proteins; EF-hand motifs

Troponin C (TpnC), one of the three troponin polypeptides in the muscle thin filament, is a key controlling element of muscle contraction. Its calcium binding capability has been established and well studied in vertebrates (Filatov et al., 1999). In contrast much less information is available concerning the function of invertebrate TpnCs. In *Drosophila melanogaster*, three genes (DmTpnC41C, DmTpnC47D and DmTpnC73F) coding for

Troponin C were identified (Fyrberg et al., 1994). It was remarkable that within the small *D. melanogaster* genome, a multigene family encoded TpnC, since the majority of the main structural muscle components are encoded by single genes (for a review, see Bernstein et al., 1993). The identification of a family of TpnC genes raised the possibility that each isoform could play a distinct role in muscle development and function. The observation that one of the three TpnC genes (DmTpnC41C) is specifically expressed at the adult stage supported this argument (Fyrberg et al., 1994). Doubts remained about whether the whole repertoire of TpnC genes in *D. melanogaster* had been identified. The sequence database entry (AF047329) for a TpnC gene in *D. silvestris* (Davis et al., 1998) suggested that additional TpnC genes might reside in the *D. melanogaster* genome. This turned out to be accurate. In this article we identify and characterize two new TpnC genes DmTpnC25D and DmTpnC41F, the latter, recently

**Abbreviations:** Tpn, Troponin; Dm, *Drosophila melanogaster*; IFM, indirect flight muscles; TDT, tergal depressor of the trochanter muscle; PCR, polymerase chain reaction.

\* Corresponding author. Tel.: +34-91-397-54-09; fax: +34-91-585-44-01.

E-mail address: roberto.marco@uam.es (R. Marco).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Present address: Department of Biology, University of Utah, 257 South 1400 East, Salt Lake City, UT 84112, USA.

To identify the *D. melanogaster* TpnC gene homologue of the gene found in *D. silvestris*, BLAST analyses were performed using it as query on the BDPG server. The results showed a novel TpnC gene with a higher similarity to the *D. silvestris* one than the three previously identified TpnCs (Fyrberg et al., 1994). At that time the corresponding open reading frame, CGI2408 had not yet been annotated in the *Drosophila* database. The gene shares enough features within its structure with the other three TpnC genes to consider it as a member of TpnC gene family of *D. melanogaster*, so CGI2408 has been renamed DmTpnC41F (AY283602) in accordance with the previous nomenclature of the TpnC genes according to chromosomal localization. Interestingly, the two adult genes, DmTpnC41C and the new DmTpnC41F map near the centromere of chromosome 2. The complete cDNA sequence was derived from RT-PCR and RACE analyses. Comparing this sequence to the fly genomic sequence (BDPG databases, Adams et al., 2000) the exon-intron structure of DmTpnC41F was established. It differs from the previously known *Drosophila* TpnC genes in that the first short exon and most of the second exons are untranslated, except for the initial methionine codon.

In searching for the complete TpnC complement in the *Drosophila* genome, an additional fly gene, CG6514, was identified. The corresponding open reading frame has not yet been identified as a TpnC homologue in the most recent annotations of the *Drosophila* genome database (Celniker et al., 2002; Misra et al., 2002). In accordance with the previous nomenclature, CG6514 is renamed DmTpnC25D (AY283601). Fig. 1 shows its structure based upon comparisons of our cDNA sequences with the *Drosophila* genome sequence. DmTpnC25D is more compact than the other DmTpnCs, but shares the common TpnC sequence features including the presence of four EF-hands in one exon, the second one, which is separated by small introns from the mostly untranslated first and third exons. In the 5' untranslated sequence, the region corresponding to the minimal promoter in base of the high sequence conservation between *D. melanogaster* and *D. pseudoobscura* appears underlined. It extends to around 60 base pairs including some motifs potentially involved in transcription initiation that appear in boxes. A similar high degree of sequence conservation appears in the 3' untranslated region where some of the transcription termination motifs are also marked (Fig. 1).

To confirm that the new genes encode TpnC isoforms, we compared the coding sequences of all five genes, including the distribution of the different types of variation detected. The aligned sequences (Fig. 2) show a high level of conservation in terms of the number and chemical properties

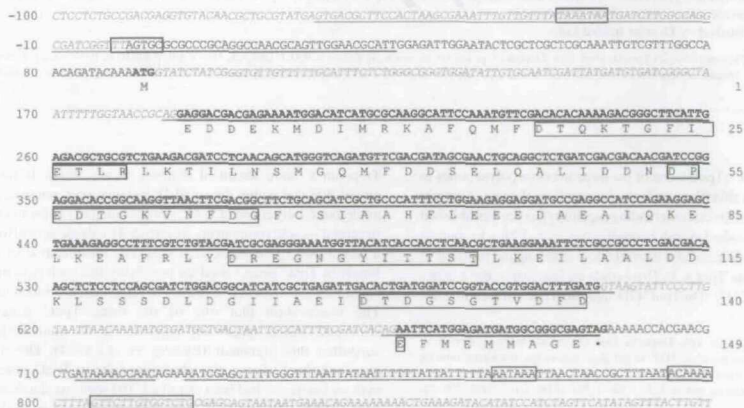


Fig. 1. Genomic structure of the gene *DmTpn25D*. In bold, the coding region; in regular characters, the transcribed non-translated region; in grey italics, introns and 5' and 3' non-transcribed sequences. The four EF-hand boxes, defined putative promoter (TATA box and initiation consensus sequences) and termination (polyadenylation signal, termination CA sequence and GU-rich downstream element, Zhao *et al.*, 1999) motifs appear boxed. The sequences conserved over 90% in *D. pseudoobscura* orthologous gene appear underlined. Numbering on the left is for DNA sequence (+1 indicates the transcription start) and on the right indicates the amino acids in the translated product.



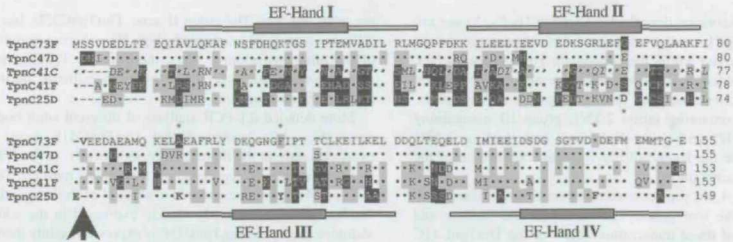


Fig. 2. Multiple alignment of the five TpnC gene products of *Drosophila melanogaster*. Amino acid conservation/identity (•), silent variation (◐) (cDNA), equivalent variation (◑) and non-equivalent variation (◑) in relation to TpnC73F isoform (except in the four \* positions in which TpnC25D is used). EF-hand domains (with the helices surrounding the loop regions) are marked with boxes. Addition of an E or V amino acid in the central helix region is indicated by an arrow. Key acidic aminoacid in core EF-hand sequences are in the 1st, 3rd, 9th, 11th and 12th positions.

of amino acids, especially in the case of DmTpnC73F and 47D. The distinction between equivalent and non-equivalent amino acids highlights the conservation of the fourth EF-hand in all TpnC genes. These data strongly suggest that we have indeed identified a new TpnC gene. Silent changes are uniformly distributed across the sequences and at the 5' and 3' ends some nucleotide triplets have been deleted or inserted in the genes. Interestingly, the DmTpnC41F protein has also an additional amino acid in the centre of the sequence separating the two globular double EF-hands domains of the dumbbell structure. This is an uncommon characteristic in Troponin Cs, but it is shared with its *Anopheles* paralogous genes (unpublished results).

As already mentioned, the carboxy-terminal EF-hands is the part of the sequence more highly conserved at the amino acid level. There are five positions within the functional core of the EF-hands that use the side chains of their amino acids to bind calcium ions (Nakayama and Kretsinger, 1993). Therefore,

the acidic amino acids present in these positions in the four EF-hands motives of each isoform were counted (Fig. 2). DmTpnC41C gene presents a 2–4–2–4 acidic amino acids distribution along the four EF-hands motives. DmTpnC41F presents a 4–2–2–4 acidic amino acids distribution. DmTpnC47D and DmTpnC73F present 1–4–1–4 acidic amino acids. DmTpnC25D presents a 1–2–2–4 pattern. Thus, three genes (DmTpnC41C, DmTpnC47D and DmTpnC73F) share the binding capabilities of the second and fourth EF-hands, while DmTpnC41F and DmTpnC25D change it, 41F interchanging the calcium binding capability of the two N-terminal EF-hands and 25D losing the binding capability of the two amino terminal EF-hands, once more an intermediate property.

We repeated the comparison between cDNA and genomic sequences with all *Drosophila* TpnC genes to define sharply the start and the finish of the transcripts and the positions of their introns (Fig. 3). In contrast to the high

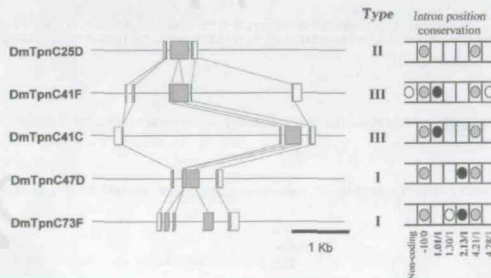


Fig. 3. Exonic structures of the five TpnC coding genes of *Drosophila melanogaster*. 5' ends on the left side of the figure. Encoding regions shaded in grey. Broken lines indicate exon conservation. On the right, we show intron position conservation among the five genes (grey dots), in the same group of genes (black dots) or the gene-specific introns (white dots). Introns are defined by several numbers following Nakayama and Kretsinger (1993) annotation. The first number indicates the EF-hand sequentially numbered from N to C terminus. The second number (following the period) show the number of the residue within the EF-hand. The third number (following the slash) indicates its phase: 0 means the intron lies between codons, 1 means between first and second nucleotides and 2 means in between the second and the third.



intron conservation described in chordate TpnCs (Yuasa and Takagi, 2001), comparisons show that intron positions are little conserved within the *Drosophila* TpnC genes. In fact, using the extent of conservation in several intron positions it is possible to define three TpnC gene groups in *Drosophila*. Group I containing intron 2.13/1, group III maintaining intron 1.01/1 and group II lacking both 1.01 or 2.13/1 introns (see the legend of Fig. 3 for an explanation of the intron nomenclature).

In Fig. 4 we present a comparison of the transcription starts of the five genes. The variety in the number and positions of these transcription starts of the DmTpnC41C gene are remarkable. The RACE analyses of the five TpnC genes at two different steps of the development larval and pupal stages gave similar results. It may be relevant in this respect that Díaz-Castillo (unpublished results) has found that the closely linked DmTpnC41C and DmTpnC41F genes are located in the heterochromatin. They occupy larger chromosomal regions than the other two genes, a well-known feature of other genes located in or close to heterochromatin rich regions (Tulin et al., 2002).

The expression profiles of the five TpnC genes during *Drosophila* development were determined by RT-PCR (Fig. 5A). They support their classification into three groups based on intron and sequence conservation grounds. As seen in the figure, group I genes (DmTpnC47D and 73F) are expressed in the embryo during the period of larval myogenesis in agreement with earlier Northern blot analyses of Fyrberg et al. (1994) and the more recent RT-PCR data of Qiu et al. (2003). The new group III gene, DmTpnC41F, shows a Northern blot expression profile (Fig. 5B) almost identical to that also published earlier for the DmTpnC41C gene. DmTpnC41F is expressed only during pupal development and in the imagoes. Actually, its highest level of expression occurs during myogenesis of

the adult muscles. The group II gene, DmTpnC25D, has a different pattern of expression (Fig. 5B), sharing features of the other two groups. Thus, the different TpnC genes show unique group-specific expression patterns during *Drosophila* development.

More detailed RT-PCR analysis of different adult body parts (Fig. 5C) confirmed that DmTpnC41F gene is expressed only in the thorax; more specifically, in the IFM and in the tergal depressor of trochanter muscle. The DmTpnC41C gene is expressed in all parts of the imago; the DmTpnC47D gene is only weakly expressed in the adult abdomens and gene DmTpnC73F is expressed mainly there. DmTpnC25D in addition to its larval expression is strongly expressed in adult heads and also, but weakly, in the main thorax muscles.

In situ hybridization analyses (Fig. 6) showed that DmTpnC73F was the only gene whose expression at high levels was detectable in the developing embryo. It was first detected at stage 12 in the precursors of the visceral muscles (Fig. 6A) and in skeletal myoblasts by embryonic stage 13 (Fig. 6B). At the end of embryogenesis, DmTpnC73F is expressed in all embryonic muscle lineages: skeletal, visceral, and the cardiac muscle of the dorsal vessel (Fig. 6C–E). DmTpnC73F expression was also detected at high levels in the skeletal muscles of the adult abdomen and was observed at lower levels in a subset of muscles in the head (Fig. 6H). Although expression of DmTpnC47D was also shown by RT-PCR and Northern (Fyrberg et al., 1994) to occur at embryonic and adult stages, we were unable to detect transcripts in the *in situ*'s for this gene, may be due in part to the low levels of expression of DmTpnC47D. In situ hybridization experiments with DmTpnC25D did not detect transcripts either.

In situ hybridizations of the type III TpnC genes, DmTpnC41C and DmTpnC41F, showed striking variations



Fig. 4. 5' UTR of the five genes TpnC-encoding genes in *Drosophila melanogaster*. Methionine initial codon (ATG) and consensus start of transcription sequences are in bold. The digits indicate the number of detected cDNAs found with a start at the immediately below position. Except in the case of the DmTpnC41C UTR, a unique transcription initiation point is found for the rest of the genes.

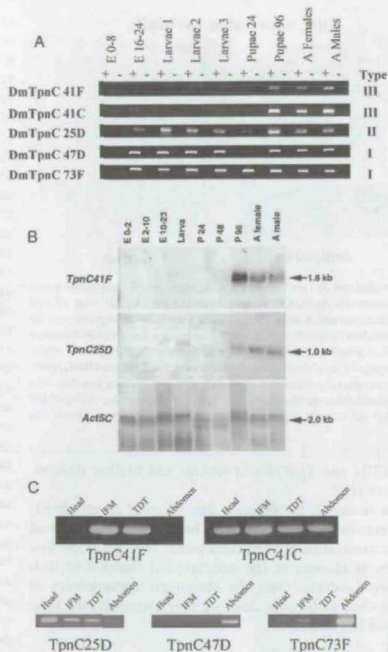


Fig. 5. Temporal expression profiles of the five TpnC genes of *Drosophila melanogaster* and in different parts of the imago. (A) RT-PCR analysis during development, (B) Northern blot during development for the recently described genes (TpnC41F and TpnC25D). E, embryos; P, pupae; A, adults. Numbers indicate hours of development at each stage except for the larvae in the right side, where 1, 2 and 3 correspond to first, second and third instars. (C) RT-PCR analysis in adult bodyparts (head, IFMs, TDT and abdomen). No bands were detected in the absence of retrotranscription (data not shown). As an additional test of their purity, the same RNA samples allowed the identification of IFM vs TDT-specific Troponin T isoforms (unpublished results). Both adult group III isoforms (upper) are strongly expressed in IFM and TDT fibres but 41F is thorax-specific and 41C appears in head and abdomen also. TpnC25D has a mainly head-specific expression but is expressed in IFMs and TDT as well according with its intermediate group II affiliation. Instead, 47D is expressed only and weakly in abdomen but 73F has some expression in IFMs in addition to its abdominal group I characteristic expression.

in the expression levels of these genes in different muscle types. DmTpnC41C transcripts were detected at high levels only in the tubular muscles of the head and thorax, including the TDT and muscles of the leg (Fig. 6I,J). Transcripts of this gene were not detected by in situ hybridization in IFMs, nor in abdominal muscles, although the RT-PCR data presented above indicate that DmTpnC41C is broadly

expressed in the adult. It has to be remembered that the RT-PCR technique allows a more sensitive detection of transcripts, but the in situ data give a better indication of the relative level of expression in the different muscles.

Similar results were obtained for DmTpnC41F expression, which is heavily expressed in the IFM musculature, but was much less detectable in the TDTs and muscles of the head and abdomen (Fig. 6K,L). Qiu et al. (2003) has also found that the corresponding orthologous gene in *Lethocerus indicus* is also IFM-specific. We conclude that DmTpnC41F expression in non-fibrillar muscles (TDT) must be considerably lower than that observed for fibrillar (IFM) muscle types.

In this letter we have identified and characterized in detail the Troponin C gene family in *D. melanogaster*. Five genes constitute the complete TpnC repertoire. Our analysis has significantly advanced our knowledge of the gene structures and temporal-spatial expression patterns. The TpnC genes are dispersed within the genome, show variant gene structures, and different patterns of expression throughout development. All the available information (intron position conservation, gene expression pattern, EF-hands properties, etc.) supports the classification of the five genes into three groups leading to a simpler, more systematic nomenclature independent of the gene chromosomal localization (see Table 1). A more comprehensive analysis which will be presented elsewhere, shows that this grouping is applicable to other insects. Table 1 summarizes all the TpnC gene expression data (RT-PCR spatio-temporal profiles, Northern blots and in situ hybridizations). They are also supported by unpublished results obtained in *D. subobscura* and *D. virilis*. DmTpnC73F, TpnC Ia, shows a general, wide expression pattern, with a maximum level in abdominal hypodermal muscles. DmTpnC47D, TpnC Ib, is mainly expressed at the larval stage of development. On the other hand, DmTpnC41C, TpnC IIIa and DmTpnC41F, TpnC IIIb, are almost exclusively expressed in adults. Expression of *Drosophila* TpnC IIIb is largely restricted to the thoracic muscles that power and control flight, with maximum expression levels in IFMs. The fifth gene, DmTpnC25D (TpnC II) has a mixed pattern of expression. It is readily expressed in adults, mostly in heads, but also shows a broad pattern of expression as *Drosophila* TpnC Ia does.

The high variability in gene structure and expression patterns that we observe for TpnC genes suggest that their origin has not been via a recent gene duplication, but represents the result of an ancient evolutionary series of events which have been retained by selective forces. What is the functional significance of retaining a large number of TpnC genes in invertebrate genomes with variant patterns of expression? A common argument is that this variation allows for fine-tuning of tissue-specific functions, and it has been clearly demonstrated on a number of occasions that there is a functional non-equivalence between isoforms of structural muscle proteins (see for examples Wells et al.,

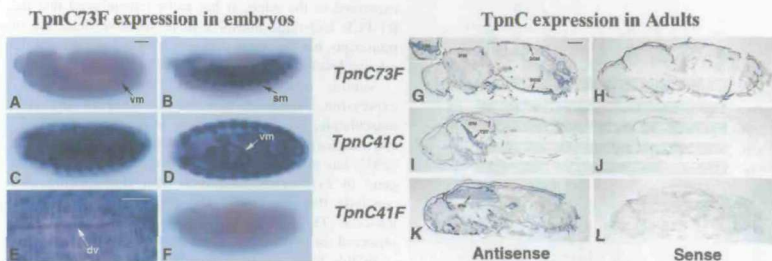


Fig. 6. Tissue-specific expression patterns of *D. melanogaster* TpnC genes. Left: A–F, expression of TpnC73F during embryogenesis. (A) Expression is first detected in precursors of the visceral muscles (vm) at stage 12. (B) Expression is subsequently detected in skeletal myoblasts (sm) by late stage 13, and continuing in skeletal muscles at stage 16 (C). (D) Ventral view showing visceral muscle expression at stage 16. (E) Dorsal view showing expression in the dorsal vessel (dv) at stage 16. (F) Stage 21 embryo hybridized with a TpnC73F sense probe shows a specific expression. All embryos are oriented with anterior to the left and dorsal side uppermost unless otherwise indicated. Bar, 100 μm. Right: G–L, expression of various TpnC genes in cryosections of pharate adults. (G) TpnC73F expression was predominantly detected in the supercontractile skeletal muscles of the abdomen (SCM) and in muscles of the head (HM, inset). (H) No specific hybridization was detected with a TpnC73F sense probe. (I) TpnC41C transcripts were detected at high levels only in the tubular muscles of the thorax, including the tubular depressor of the trochanter muscle (TDT). (J) No specific hybridization was detected with a TpnC41C sense probe. (K) TpnC41F transcripts were detected at high levels only in the fibrillar indirect flight muscles (IFM). All sections are oriented with anterior to the left and dorsal side uppermost. Bar, 250 μm.

1996; Fyrberg et al., 1998). This hypothesis is consistent with our observations that the *D. melanogaster* TpnC genes show large variation in gene expression patterns during development. We have previously argued that such a conservation in expression pattern provides supporting evidence for the presence of functionally distinct isoforms within a gene family (Lovato et al., 2001). A further prediction of the model that different TpnC genes exist to provide tissue-specific functions is that mutations in these genes should have tissue-specific phenotypes. It is interesting that the muscle actin gene repertoire has also reached a high copy number of four in both *D. melanogaster* and *D. virilis*. Two of the *D. melanogaster* genes, *Act57B* and *Act87E* have a similar expression pattern as the type I Troponin C genes, *DmTpnC1a* and *DmTpnC1b*, while the *Act79B* and *Act88F* genes (and their *D. virilis* paralogous) are expressed only as adult type III genes (Fyrberg et al., 1983; Lovato et al., 2001). Furthermore, the specific expression of *Act79B* in tubular muscles and *Act88F* in fibrillar muscles is also reflected by the enrichments of

TpnCIIIa and TpnCIIIb in tubular and fibrillar muscles, respectively.

In summary, the variation that followed genetic duplication events in the evolutionary line of insects has allowed the accumulation of expression profile changes of the new genes as changes in the structure and function of their protein products. Once the phenotypic consequences of these changes become clear, we may understand the logic behind this variation.

## 1. Materials and methods

### 1.1. Expression profiles of the five TpnC genes of *Drosophila melanogaster*

*D. melanogaster* Oregon R was used as a wild-type strain. Whole animals were collected at different developmental stages, and adult body parts (head, thorax and abdomen) were dissected in cold acetone at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Table 1  
Summary of spatio-temporal expression profiles of Troponin C genes in different muscle types

Gene name	Alternative name based on sub type	Larvae	Pupae	Imagoes heads	IFM	TDT	Imagoes abdomens
TpnC 73F	TpnC Ia	+	+	+	±	±	+++
TpnC 47D	TpnC Ib	++	+	–	–	–	+
TpnC 25D	TpnC II	+	+	++	+	+	+
TpnC 41C	TpnC IIIa	–	++	+	+	+++	–
TpnC 41F	TpnC IIIb	–	++	–	+++	+	–

Expression results are compiled here, from – for no expression to +++ for high expression levels in the different muscles types of *Drosophila*. A simpler, more general, alternative designation for the genes in the family is introduced in the table. Genes are named first by its type (I, II or III) followed by a letter if more than one gene exists in the same group. This nomenclature is applicable to diptera and probably to at least all insects (unpublished results).



Specific muscles (IFM or TDT) were recovered from animals pre-treated for at least 1 week in dehydrating acetone solution which facilitates the fibre isolation. RNA was extracted using TRIzol Reagent® (Gibco). Reverse transcription was performed using oligo-dT (1 µg) upon total RNA (2 µg). Specific probes were designed for each gene, based on known *D. melanogaster* sequences and PCR were carried out upon products of reverse transcription (30–35 amplification cycles of 94 °C/30 s, 55–60 °C/45 s, 72 °C/45 s) and the RT-PCR products were cloned for sequencing.

The complete cDNAs sequence of the five TpnC genes were obtained using RLM-RACE (Ambion) to identify the exact beginnings and endings of transcription and the number of times the transcription starts or ends in these positions.

### 1.2. Northern blot analysis

Northern blotting of staged total RNA samples was performed using standard procedures (Sambrook et al., 1989). Fractionated RNAs were transferred to Hybond N+ (Amersham) and hybridized with radioactively labelled probes for each gene. To ensure that equivalent amounts of RNA were present in samples for each developmental timepoint, blots were also hybridized with a probe directed against the unique 3' UTR of the Act5C cytoplasmic actin gene (Fyrberg et al., 1983).

### 1.3. In situ hybridization protocols

In situ hybridization to detect embryonic patterns of gene expression was performed as described by O'Neill and Bier (1994) upon embryos aged 0–18 h after egg laying. In situ hybridization for adult muscles was performed as described by Lovato et al. (2001) upon cryosections of pharate adult pupae.

### 1.4. Sequence manipulation

The genomic sequences of the five TpnC genes were obtained from FlyBase (Adams et al., 2000), as well as Fyrberg's (1994) located transcripts. DmTpn25D and DmTpn41F complete transcripts were submitted to the Genbank. All their accession numbers (gen/transcript) are: DmTpnC25D: (FBgn0031692/AY283601), DmTpnC41C: (FBgn0013348/NM078895); DmTpnC41F: (FBgn0033027/AY283602); DmTpnC47D: (FBgn0010423/NM057620); DmTpnC73F: (FBgn0010424/NM079398). The cDNA and genomic sequences of the five TpnC genes were compared using Gene Jockey II (Biosoft) or Bioedit (Hall, 1999), and oligonucleotide probes were designed using Oligo 4.0 (National Biosciences, Inc.).

### Acknowledgements

We are especially grateful to Dr John Sparrow, University of York, UK, and Dr Margarita Cervera, Alfredo Villasanté and José Antonio Mas, Universidad Autónoma de Madrid, Spain, for critical review of the manuscript. This research was supported by grants from the Spanish Government PB96-0069, ESP1999-0379-CO2 and PNE-008/2001-C, and by GM61738 awarded by the National Institutes of Health to RMC.

### References

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., et al., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.
- Barbas, J.A., Galceran, J., Torroja, L., Prado, A., Ferrus, A., 1993. Abnormal muscle development in the heldup3 mutant of *Drosophila melanogaster* is caused by a splicing defect affecting selected troponin I isoforms. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1433–1439.
- Benoit, P., Mas, J.A., Marco, R., Cervera, M., 1998. Differential muscle-type expression of the *Drosophila* Troponin T Gene. *J. Biol. Chem.* 273, 7538–7546.
- Bernstein, S.I., O'Donnell, P.T., Cripps, R.M., 1993. Molecular genetic analysis of muscle development, structure, and function in *Drosophila*. *Int. Rev. Cytol.* 143, 63–152.
- Celniker, S.E., Wheeler, D.A., Krommiller, B., Carlson, J.W., Halpern, A., Patel, S., et al., 2002. Finishing a whole-genome shotgun: release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. *Genome Biol.* 3 RESEARCH00079.
- Davis, T., Kurihara, J., Yamamoto, D., 1998. Sequence for a *Drosophila silvestris* Troponin C gene. GenBank Direct Submission (AF047329).
- Filatov, V.L., Katrunkha, A.G., Balargina, T.V., Gusev, N., 1999. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry (Moscow)* 64, 969–985.
- Fyrberg, E.A., Mahaffey, J.W., Bond, B.J., Davidson, N., 1983. Transcripts of the six *Drosophila* actin genes accumulate in a stage- and tissue-specific manner. *Cell* 33, 115–123.
- Fyrberg, C., Parker, H., Hutchison, B., Fyrberg, E.A., 1994. *Drosophila melanogaster* genes encoding three troponin-C isoforms and a calmodulin-related protein. *Biochem. Genet.* 32, 119–135.
- Fyrberg, E.A., Fyrberg, C.C., Biggs, J.R., Saville, D., Beall, C.J., Ketchum, A., 1998. Functional nonequivalence of *Drosophila* actin isoforms. *Biochem. Genet.* 36, 271–287.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Lovato, T.L., Meadows, S.M., Baker, P.W., Sparrow, J.C., Cripps, R.M., 2001. Characterization of muscle actin genes in *Drosophila virilis* reveals significant molecular complexity in skeletal muscle types. *Insect Mol. Biol.* 10, 333–340.
- Misra, S., Crosby, M.A., Mungall, C.J., Matthews, B.B., Campbell, K.S., Hradecky, P., et al., 2002. Annotation of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome: a systematic review. *Genome Biol.* 3 research0083.1–22.
- Nakayama, S., Kretsinger, R.H., 1993. Evolution of EF-Hand calcium-modulated proteins. III. Exon sequences confirm most dendrograms based on protein sequences: calmodulin dendrograms show significant lack of parallelism. *J. Mol. Evol.* 36, 458–476.
- O'Neill, J.V., Bier, E., 1994. Double-label in situ hybridization using biotin and digoxigenin-tagged RNA probes. *Biotechniques* 17, 870ec also pages 874–875.



- Qiu, F., Lakey, A., Agianian, B., Hutchings, A., Butcher, G.W., Labelle, S., et al., 2003. Troponin C in different insect muscle types: identification of an isoform in *Lethocerus*, *Drosophila* and *Anopheles* that is specific to asynchronous flight muscle in the adult insect. *Biochem. J.* 371, 811–821.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Tulin, A., Stewart, D., Spradling, A.C., 2002. The *Drosophila* heterochromatic gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development. *Genes Dev.* 16, 2108–2119.
- Wells, L., Edwards, K.A., Bernstein, S.I., 1996. Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *EMBO J.* 15, 4454–4459.
- Yusa, H.J., Takagi, T., 2001. The genomic structure of the Sandworm, *Perinereis vanacaurica tetradentata*, Troponin C. *Gene* 268, 17–22.
- Zhao, J., Hyman, L., Moore, C., 1999. Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 405–445.